

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA GEOGRÁFICA, GEOFÍSICA E ENERGIA



# Novas tecnologias de colheita de microalgas para a produção de biodiesel

Marta Moreira dos Santos

**Dissertação**

**Mestrado Integrado em Engenharia da Energia e do Ambiente**

**2013**

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA GEOGRÁFICA, GEOFÍSICA E ENERGIA



# Novas tecnologias de colheita de microalgas para a produção de biodiesel

Marta Moreira dos Santos

**Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia da Energia e do Ambiente**

Orientadores:

Doutora Luísa Maria Gouveia da Silva (LNEG)

Doutora Ana Cristina Ramos de Oliveira Justino (FCUL)

**2013**

## **Agradecimentos**

Quero agradecer às minhas três “tutoras” que me encaminharam neste projecto não só pela curiosidade, mas também pela vontade de inovar e descobrir novos caminhos para um futuro mais promissor, que partilharam comigo a sua sabedoria e que sofreram comigo pelos meus erros e pelas minhas fraquezas com a sua infinita paciência.

Ao LNEG e a toda a equipa espectacular que me acompanhou e ajudou em cada processo para atingir as minhas metas.

Agradeço à FCT e o seu projecto PTDC/ PTDC/AAC-AMB/100354/2008 Microalgae as a sustainable raw material for biofuels production (biodiesel, bioethanol, bio-h<sub>2</sub> and biogas).

E ainda os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que me deram força e ânimo nos momentos mais difíceis onde até cheguei a questionar o propósito do meu trabalho, principalmente ao Luca, parceiro de laboratório e bom amigo, sempre disponível para ajudar, incentivar e ensinar, aos meus amigos mais chegados que de vez em quando chamavam-me à razão para não desistir apesar das adversidades, e principalmente à minha Mãe, que a ela devo tudo na minha vida, pelo esforço e luta constante, para que eu chegasse onde cheguei hoje.

## Abstract

In order to meet the growing need of raw materials for fuels, different renewable alternatives have been proposed, and microalgae show an interesting potential for the development of biofuels. They have several advantages compared to other raw materials for the production of biodiesel, such as rapid growth, smaller areas of occupation, don't compete with food crops, among others, making them a promising case study for future applications in large scale. Although, there are also disadvantages that have hampered the development of microalgae based biodiesel. Because they have very small cell size, have low biomass concentration and are somewhat unstable in large volumes, the harvesting process becomes very costly and, therefore challenging. Therefore, there is the need to find better and low cost more efficient techniques to separate microalgae biomass from their growth medium and keeping the good quality.

In this work, electrocoagulation was studied to harvest *Nannochloropsis* sp. microalga, causing sedimentation/flotation of the cells, and consequently biomass separation. This technology proved to be a fast, efficient and low cost method that allows a recovery of biomass without chemical contamination. Therefore, it was evaluated and optimized, and the best recovery efficiency (>97%) was achieved using a current density of 8.3 mA/cm<sup>2</sup> for 10 min. The quality of the recovered microalgal biomass was evaluated in terms of total lipids, fatty acid and pigment profiles where no significant differences were observed after the treatment.

The energetic study of this process of electrocoagulation compared to the most common ones like centrifugation, flocculation/centrifugation demonstrated that the studied system is more advantageous not only in terms of consumption of energy, but also because of the minimum contamination of the harvested biomass and preservation of its quality.

**Keywords:** *Nannochloropsis* sp., harvesting, electrocoagulation, flotation/sedimentation, oils, pigments, extraction

## Resumo

De forma a fazer face à crescente necessidade de matéria-prima para os combustíveis, várias alternativas têm sido propostas, sendo que as microalgas revelam um potencial interessante. Apresentam diversas vantagens comparativamente a outras matérias-primas para produção de biodiesel, como o rápido crescimento, menor área de ocupação, não competem com culturas alimentares, maior conteúdo em óleos, a colheita da biomassa pode ser diária, entre outras, tornando-as num caso de estudo promissor para futuras aplicações em larga escala. Embora sejam conhecidas várias vantagens, também há desvantagens que têm dificultado o desenvolvimento da tecnologia de microalgas para biocombustíveis. Por terem um tamanho celular muito reduzido e uma baixa concentração de biomassa, o processo de colheita torna-se muito dispendioso. Daí a necessidade de encontrar técnicas eficientes, rápidas e de baixo custo para a separação da biomassa do seu meio de cultura, sem a sua contaminação.

Neste trabalho foi estudado o efeito da electrocoagulação na cultura da microalga *Nannochloropsis* sp., provocando a floculação das células com separação de fases e consequente sedimentação/flotação. Esta tecnologia revelou ser um método rápido, eficiente e de baixo custo que permite uma colheita da biomassa sem a contaminação química desta. Assim, foi avaliada e otimizada a técnica de electrocoagulação como método de separação da biomassa. A melhor eficiência de remoção (> 97%) foi obtida usando uma densidade de corrente de 8,3 mA/cm<sup>2</sup> durante 10 min. A qualidade da biomassa foi avaliada em termos de lípidos totais, perfil de ácidos gordos e pigmentos, não tendo sido observadas diferenças significativas após o tratamento.

O estudo energético do processo de electrocoagulação comparativamente aos processos mais comuns como a centrifugação, floculação/centrifugação, demonstrou que o sistema usado é mais vantajoso não só em termos de consumos de energia, mas também pela mínima contaminação da biomassa colhida e a preservação da qualidade desta.

**Palavras-chave:** *Nannochloropsis* sp., colheita, electrocoagulação, flotação/sedimentação, óleos, pigmentos, extracção

# Índice

|   |     |
|---|-----|
| Agradecimentos.....   | i   |
| Abstract .....  | ii  |
| Resumo.....   | iii |
| Índice de Tabelas.....  | vi  |
| Índice de Figuras .....                                       | vii |
| 1. Introdução.....  | 1   |
| 1.1 Consumo energético e biocombustíveis .....                | 1   |
| 1.1.1 Panorama europeu .....                                  | 1   |
| 1.1.2 Situação em Portugal.....                               | 4   |
| 1.2 Biodiesel: produção, características e vantagens.....     | 6   |
| 1.3 Microalgas .....  | 9   |
| 1.3.1 Potencial para produção de biodiesel .....              | 10  |
| 1.3.2 Métodos de produção .....                               | 13  |
| 1.3.3 Factores de crescimento .....                           | 15  |
| 1.3.4 Métodos de colheita.....                                | 16  |
| 1.3.5 Outras aplicações.....                                  | 20  |
| 2. Objectivo do Trabalho.....                                 | 22  |
| 3. Materiais e métodos.....                                   | 23  |
| 3.1 Meio e condições de crescimento da microalga .....        | 23  |
| 3.2 Processo de Electrocoagulação.....                        | 23  |
| 3.3 Tratamento da biomassa.....                               | 24  |
| 3.4 Processo de extracção dos óleos.....                      | 25  |
| 3.5 Processo de extracção de pigmentos .....                  | 26  |
| 3.6 Análise de pigmentos .....                                | 26  |
| 3.7 Análise de ácidos gordos .....                            | 27  |
| 3.7.1 Preparação de ésteres metílicos dos ácidos gordos ..... | 27  |
| 3.7.2 Análise cromatográfica.....                             | 27  |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3.7.3 | Análise da concentração de iões de alumínio .....                | 28 |
| 4.    | Resultados e discussão .....                                     | 29 |
| 4.1   | Efeito da densidade de corrente.....                             | 29 |
| 4.2   | Efeito do tempo de repouso.....                                  | 30 |
| 4.3   | Efeito da área de eléctrodos vs volume de cultura.....           | 31 |
| 4.4   | Efeito da concentração de biomassa e da fase de crescimento..... | 32 |
| 4.5   | Efeito do tempo de Electrocoagulação .....                       | 34 |
| 4.6   | Qualidade da biomassa após Electrocoagulação .....               | 34 |
| 4.6.1 | Conteúdo de óleo e perfil de ácidos gordos.....                  | 35 |
| 4.6.2 | Conteúdo e perfil de pigmentos.....                              | 35 |
| 4.6.3 | Conteúdo de Alumínio .....                                       | 37 |
| 4.7   | Energia consumida pela remoção da biomassa .....                 | 37 |
| 5.    | Conclusões .....   | 41 |
| 6.    | Trabalhos futuros.....   | 42 |
| 7.    | Referências .....  | 43 |

## Índice de Tabelas

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 - Incorporação de Biodiesel.....   | 6  |
| Tabela 2 – Composição em ácidos gordos (%) de culturas típicas para a produção de biodiesel.....  | 7  |
| Tabela 3 – Propriedades técnicas do biodiesel.....  | 8  |
| Tabela 4 – Vantagens e desvantagens do biodiesel.....   | 8  |
| Tabela 5 – Percentagem de óleo de diferentes espécies de microalgas.....  | 12 |
| Tabela 6 – Comparação entre sistemas abertos e fechados.....  | 15 |
| Tabela 7 – Características de diferentes técnicas de colheita.....  | 18 |
| Tabela 8 – Área de submersão para cada espessura de eléctrodo .....   | 29 |
| Tabela 9 – Eficiência de remoção (%) para as diferentes intensidades de corrente e espessura de eléctrodo, após um repouso de 30 min .....                | 29 |
| Tabela 10 – Eficiência de remoção (%) para diferentes razões área de eléctrodo/volume de cultura...   | 31 |
| Tabela 11 – Eficiência remoção para períodos de crescimento de 4, 8 e 11 semanas.....   | 34 |
| Tabela 12 – Eficiência de remoção (%) para diferentes tempos de electrocoagulação .....   | 34 |
| Tabela 13 – Perfil de ácidos gordos da biomassa controlo (sem electrocoagulação) e da biomassa recolhida por diferentes densidades de corrente de EC..... | 35 |
| Tabela 14 – Dados para avaliação energética de diferentes cenários de colheita .....  | 39 |



## Índice de Figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 - Consumo de energia por sectores na UE-27 .....   | 2  |
| Figura 2 - Consumo de energia por modo de transporte na UE-27 .....   | 2  |
| Figura 3 - Consumo de energia por tipo de combustível na UE-27 .....  | 3  |
| Figura 4 - Produção de biocombustíveis na UE-27 .....   | 3  |
| Figura 5 - Importação energética em Portugal .....  | 4  |
| Figura 6 - Consumo energético por sectores em Portugal.....   | 5  |
| Figura 7 - Distribuição do consumo de combustíveis em Portugal.....   | 5  |
| Figura 8 - Consumo por combustível e incorporação de biodiesel no sector dos transportes em Portugal .....                                | 6  |
| Figura 9 - Reacção de transesterificação .....  | 7  |
| Figura 10 - Aplicações industriais das microalgas .....   | 9  |
| Figura 11 - Processos de obtenção de produtos energéticos derivados de microalgas.....  | 10 |
| Figura 12 - Produção de óleo a partir de diferentes culturas .....  | 11 |
| Figura 13 - Percentagens de ocupação de terrenos para as diferentes culturas, para obtenção da mesma quantidade de óleo.....              | 12 |
| Figura 14 - Diferentes espécies de microalgas .....   | 12 |
| Figura 15 - Sistema de tanques abertos, raceway ponds .....   | 13 |
| Figura 16 - Sistema de tanques com cobertura.....   | 14 |
| Figura 17 - Sistemas de fotobioreactores fechados .....   | 14 |
| Figura 18 - Exemplo de central de produção de microalgas para biocombustível .....  | 15 |
| Figura 19 - Técnicas de colheita: a) Centrifugação; b) Flocculação e interacção entre microalgas e flocculantes; c) Electroflotação ..... | 17 |
| Figura 20 - Esquema de montagem para electrocoagulação .....  | 19 |
| Figura 21 - Esquema de montagem para electrocoagulação .....  | 24 |
| Figura 22 - Processo de moagem com moinho de bolas .....  | 25 |
| Figura 23 - Extração de óleos em Soxhlet.....   | 25 |
| Figura 24 - Placa TLC para separação/identificação dos carotenóides .....   | 26 |
| Figura 25 - Esquema de processo para a transesterificação .....   | 27 |
| Figura 26 - Eficiência de remoção (%) para diferentes intensidades de corrente e áreas de eléctrodo, após um repouso de 30 min.....       | 30 |
| Figura 27 - Eficiência de remoção (%) para diferentes densidades de corrente e para os diferentes tempos de repouso (30 min e 24 h) ..... | 31 |
| Figura 28 - Eficiência de remoção (%) para diferentes razões área de eléctrodo/volume de cultura....                                      | 32 |
| Figura 29 - Cultura de microalga em diferentes estados de crescimento/concentração de biomassa ...  | 32 |
| Figura 30 - Análise semanal da eficiência de remoção consoante fase de crescimento.....   | 33 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 31 - Efeito do tempo de electrocoagulação na eficiência de remoção .....  | 34 |
| Figura 32 - Espectro de absorção de pigmentos antes e depois da electrocoagulação .....  | 36 |
| Figura 33 - Perfil de pigmentos antes e depois da electrocoagulação .....  | 37 |
| Figura 34 - Eficiência de remoção vs energia consumida em cada experiência .....   | 38 |
| Figura 35 - Estimativas de avaliação energética de diferentes cenários de colheita para produção de biodiesel (1000 MJ <sub>biodiesel</sub> )..... | 39 |



## **1. Introdução**

A crescente evolução da sociedade tem vindo a acentuar cada vez mais a procura de soluções energéticas e tecnológicas para satisfazer as necessidades de cada nação e de cada indivíduo. A procura de recursos limpos que permitam assegurar as necessidades energéticas futuras constitui um dos maiores desafios da actualidade.

Cada vez mais nos deparamos com um agravamento nos preços dos combustíveis bem como no aumento do consumo destes, e o foco internacional sobre o impacto ambiental das emissões de gases têm vindo a conduzir à procura de recursos renováveis e desenvolvimento de tecnologias alternativas e mais verdes que suportem a indústria e as necessidades do mercado mundial.

Na União Europeia, o sector dos transportes é responsável por cerca de um quarto das emissões de gases com efeito de estufa (1), pelo que nos devemos debruçar sobre quais as formas e soluções mais eficazes para reduzir esta “fatia” de poluição, quer através de veículos mais limpos e eficientes, quer através da utilização de biocombustíveis que permitam reduzir a dependência energética dos combustíveis fósseis.

Os biocombustíveis são recursos biodegradáveis, não-tóxicos e renováveis, e apresentam vantagens ambientais pela sua imensa contribuição na redução de emissões de poluentes, pelo que representam uma alternativa energética cada vez mais explorada.

Contudo, a actual geração de biocombustíveis que recorre às culturas alimentares (por ex. milho, soja, colza), tem levado a um aumento do preço dos alimentos bem como à desflorestação de terras, além de contribuir para a produção de elevadas emissões de gases com efeito de estufa e elevados consumos de água potável que poderia abastecer, durante anos, civilizações carenciadas deste recurso.

Na procura de fontes energéticas mais “verdes”, tem havido um interesse crescente pelas algas, que têm revelado um grande potencial como energia alternativa. Neste caso, especificamente as microalgas apresentam-se como sendo a próxima geração de biocombustíveis, em particular, de biodiesel, visto que têm a capacidade de duplicar a sua biomassa várias vezes por dia, produzindo pelo menos 10 a 20 vezes mais óleo que as actuais culturas alimentares (2).

O que este processo tem de mais interessante é que basta utilizar recursos naturais que proporcionem a realização da fotossíntese, como a luz solar, água (salgada ou doce) e dióxido de carbono, para originar uma energia mais limpa. O principal desafio neste momento será a optimização dos processos de produção, colheita e extracção dos óleos, e ainda a identificação e manipulação dos recursos biológicos que apresentem maior potencial de exploração de forma a valorizar esta fonte energética num futuro próximo.

### **1.1 Consumo energético e biocombustíveis**

#### **1.1.1 Panorama europeu**

O consumo de energia final na UE-27 nos vários sectores, sofreu várias oscilações entre 2000 e 2011. No entanto é possível verificar que o sector com maior nível de consumo neste período foi sempre o dos transportes, tendo apresentado um consumo de quase um terço (33%) da energia final consumida na EU-27 (Figura 1).

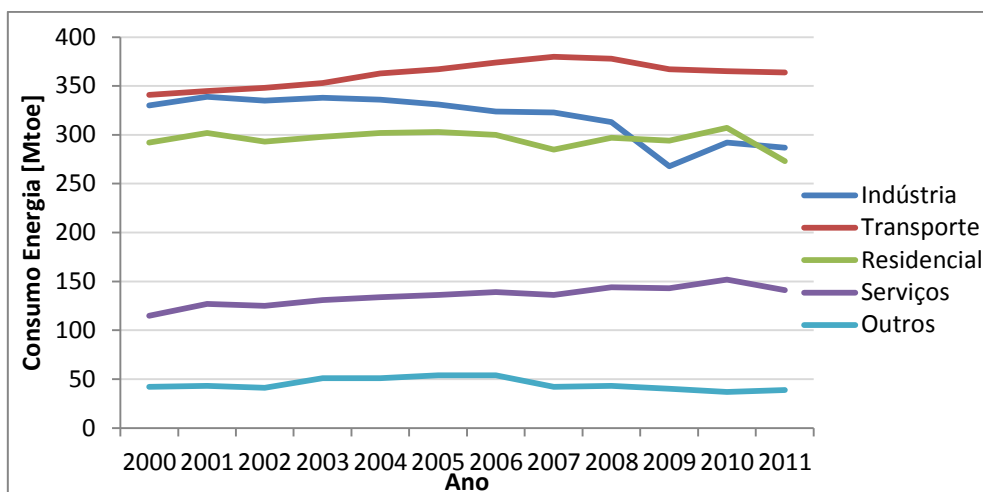


Figura 1 - Consumo de energia por sectores na UE-27 (3)

Dentro do sector dos transportes, o que apresenta a taxa mais significativa de consumo é o sector rodoviário, que em 2011 atingiu valores de 83% do total de energia consumida (Figura 2).

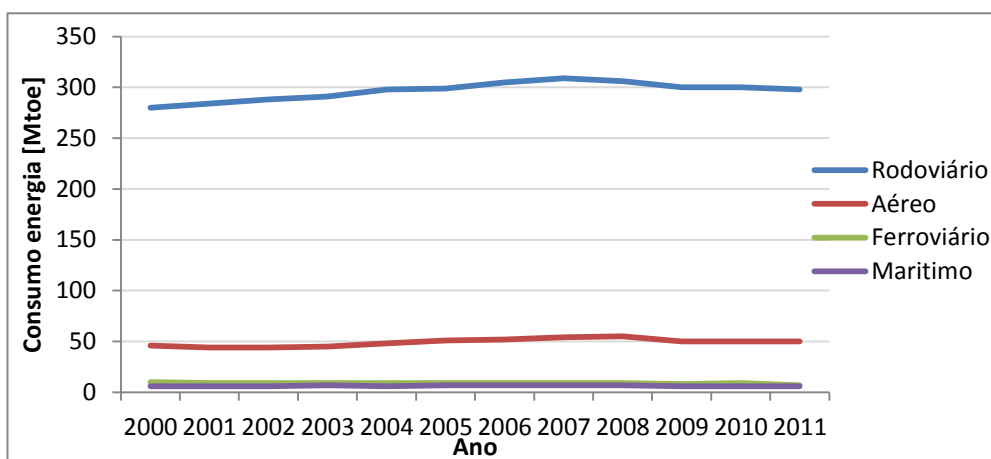


Figura 2 - Consumo de energia por modo de transporte na UE-27 (3)

Na última década observaram-se mudanças significativas no *mix* de combustíveis consumidos no sector dos transportes. Verificou-se aumentos em 2011 do gasóleo/gás, perfazendo um total de 53% (cerca de 9% mais que em 2000) do consumo de combustível, e um decréscimo contínuo da gasolina de 39% em 2000 para 25% em 2011. Por sua vez, começa a ser evidente o crescimento dos biocombustíveis a partir de 2004, pela directiva que foi implementada em 2003 – Directiva 2003/30/EC (Figura 3).

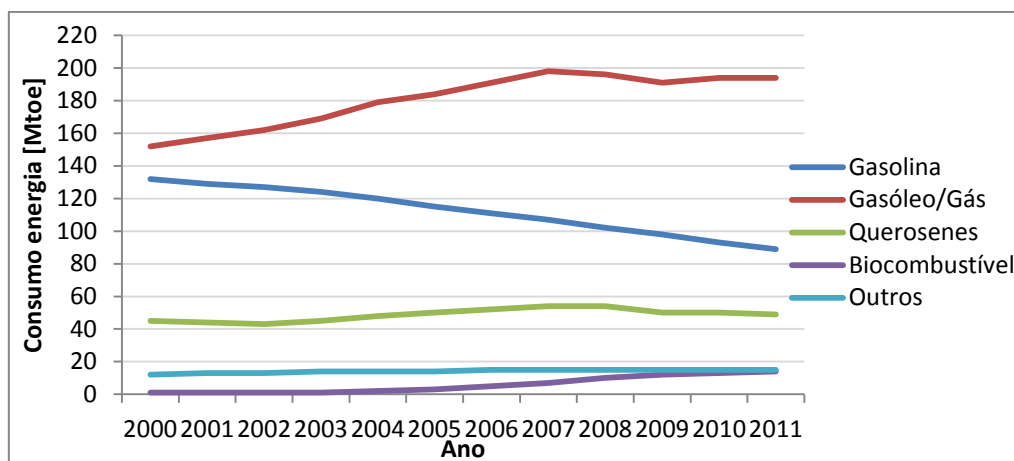


Figura 3 - Consumo de energia por tipo de combustível na UE-27 (3)

Esta directiva veio estabelecer que os Estados Membros fixassem metas sobre as quotas de biocombustíveis ou outros combustíveis de origem renovável a introduzir no sector dos transportes, que substituíssem a gasolina e o gasóleo, o que levou a um aumento de produção e introdução dos biocombustíveis no mercado (4). Em 2009, a Directiva 2009/28/CE, que altera e revoga a Directiva 2003/30/CE, estabeleceu uma nova meta, para a UE-27, de 10% em teor energético de energias renováveis no sector dos transportes em 2020, incluindo biocombustíveis, electricidade renovável ou hidrogénio produzido a partir de energia renovável. No entanto, apenas os biocombustíveis representam uma solução a curto prazo, pois é possível serem utilizados nos veículos actuais. Porém, é preciso garantir que este recurso tenha um crescimento sustentável e, por isso, é definido pela directiva que os biocombustíveis terão de cumprir alguns critérios de sustentabilidade, como a redução das emissões de GEE e uma produção que tenha impacto negativo na biodiversidade e uso de solos (5).

Entre 2006 e 2012, a capacidade de produção de biocombustíveis da UE-27 cresceu cerca de 28%, um aumento de quase três vezes o valor de 2006 (Figura 4). A Alemanha foi o país em que se verificou um maior incremento, cerca de 33% do total da produção da UE-27, seguido pela Espanha com 28% e da França com 14% (6).

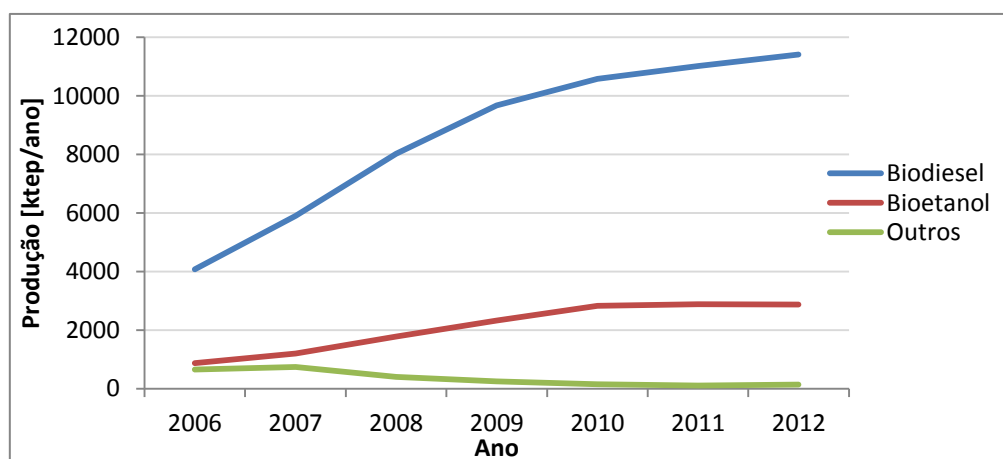


Figura 4 – Consumo de biocombustíveis no sector dos transportes na UE-27

### 1.1.2 Situação em Portugal

Relativamente ao caso português, o Decreto-Lei 62/2006 transpôs para a ordem jurídica nacional a Directiva 2003/30/CE, tendo estabelecido metas idênticas às europeias, e sendo criados os mecanismos para inserção de quotas de biocombustíveis no mercado, regulando a produção do biocombustível e a sua comercialização (7). Mais tarde, o Decreto-Lei 89/2008 veio estabelecer as normas referentes às especificações técnicas dos biocombustíveis, para o controlo de qualidade dos combustíveis e comercialização de misturas de biocombustíveis em concentrações superiores a 5% (8). Em 2009, foram fixadas quotas obrigatórias de incorporação de biocombustíveis em gásóleo rodoviário pelo Decreto-Lei 49/2009 (9). Essas quotas eram de 6% para 2009 e 10% para 2010. Em 2010, o Decreto-Lei 117/2010 transpôs para a legislação nacional a Directiva 2009/29/CE, nomeadamente no que diz respeito aos critérios de sustentabilidade para produção e utilização de biocombustíveis e bio líquidos e aos limites de incorporação para os anos 2011 até 2020. Assim, as quotas passaram a ser de 5% para 2011 e 2012, 5,5% para 2013 e 2014, 7,5% para 2015 e 2016, 9% para 2017 e 2018 e ainda 10% para 2019 e 2020 (10).

Entre o período de 2000 a 2009, a dependência energética em Portugal manteve-se entre 82 e 85% com algumas variações ligeiras, verificando-se no ano de 2011 um decréscimo para cerca de 75% (Figura 5), não só devido às metas que têm sido implementadas pela Comissão Europeia de redução das emissões de GEE mas também pelo desenvolvimento das fontes de energia renovável (FER) e aumento da capacidade instalada na produção de energia eléctrica.

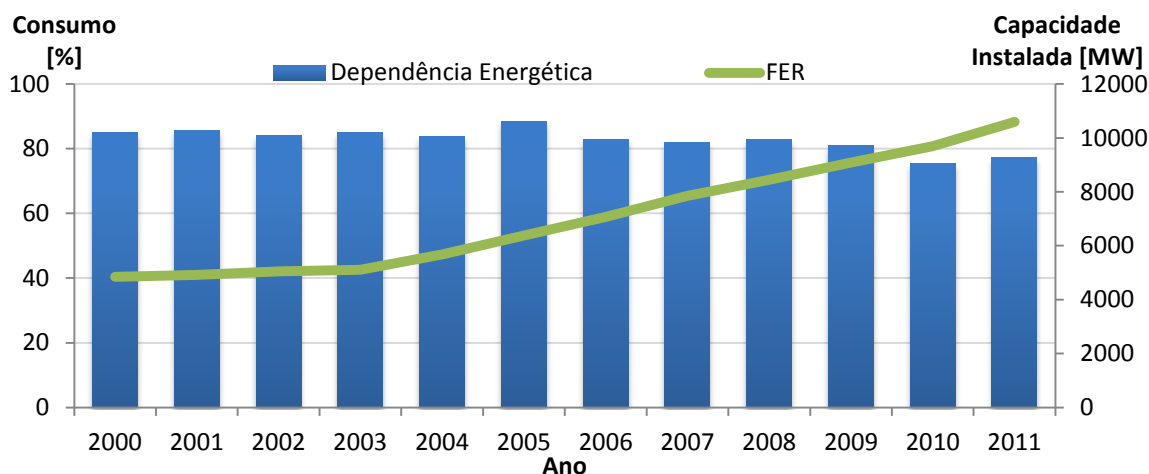


Figura 5 - Importação energética em Portugal (3)

De entre os vários sectores, o dos transportes tem sido o responsável pelo maior consumo energético do país, tendo-se verificado de 2000 para 2011 um aumento na taxa de consumo, comparativamente aos outros sectores (Figura 6). O meio de transporte que tem apresentado uma maior percentagem de consumo tem sido o rodoviário, representando cerca de 40% do total dos sectores (Figura 6).

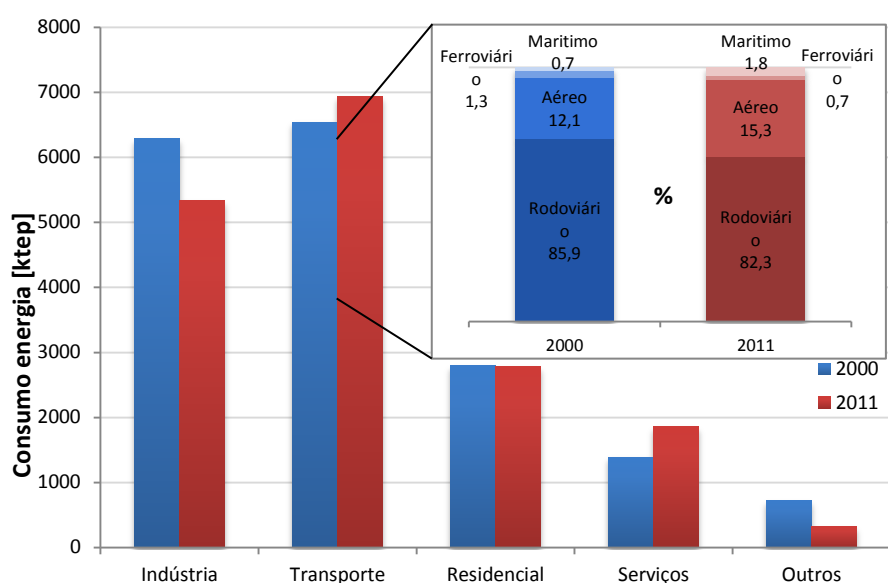


Figura 6 - Consumo energético por sectores em Portugal (3)

Em 2010, os combustíveis que tiveram maior representação nos meios de transporte foram o gasóleo e a gasolina (Figura 7). No entanto, no período de 2000 a 2010, verificou-se uma redução no consumo da gasolina e um aumento do consumo de gasóleo devido ao agravamento dos preços do barril de petróleo, que afecta ambos os combustíveis, principalmente a gasolina, pelo que os consumidores optaram por veículos a gasóleo que têm um consumo mais económico.

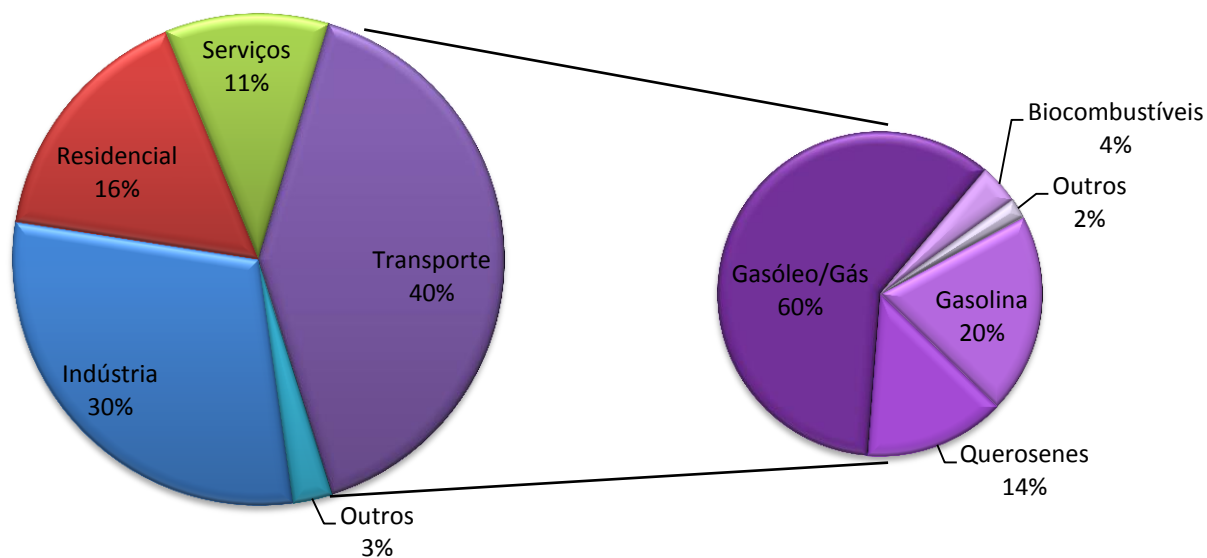


Figura 7 - Distribuição do consumo de combustíveis em Portugal em 2010 (3)

A introdução de biocombustíveis no sector dos transportes teve início em 2004, mas com valores muito baixos (menos de 1 tonelada), começando a ter alguma evidência a partir de 2005, com produções de 158,5 toneladas de biodiesel (6). Foi em 2006 que a produção de biodiesel começou a ter uma incorporação (Tabela 1) nos transportes rodoviários de cerca de 1% tendo, nesse ano, entrado em funcionamento cinco unidades industriais (duas grandes e três pequenas) para produção deste



biocombustível com capacidade total de 200 000 ton/ano. No ano de 2008, os valores de incorporação apresentaram uma redução comparativamente a 2007. Registou-se uma nova subida na incorporação do biodiesel em 2009, e foi definido em Decreto-Lei que o objectivo para o gasóleo rodoviário seria incorporar 6% (v/v) de biodiesel em 2009 e 10% (v/v) no ano de 2010. No entanto, verificou-se uma incorporação de apenas 4% ficando aquém do estabelecido (11), tendo continuado a existir um decréscimo em 2011 e 2012 (6) provavelmente pelas medidas políticas implementadas pelo Governo Português que vieram a desacelerar o crescimento deste sector (Figura 8).

Tabela 1 - Incorporação de Biodiesel (6)

| Ano  | Incorporação [tep] |
|------|--------------------|
| 2006 | 70 312             |
| 2007 | 134 959            |
| 2008 | 128 109            |
| 2009 | 225 051            |
| 2010 | 325 254            |
| 2011 | 310 253            |
| 2012 | 284 209            |

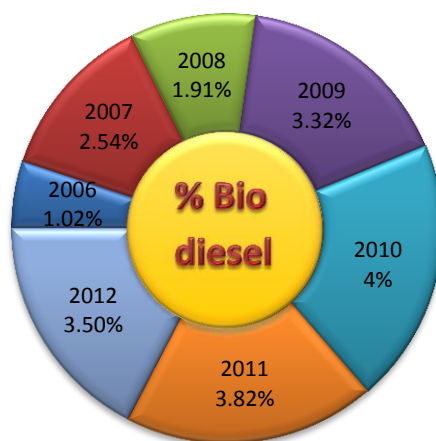


Figura 8 – Percentagem de incorporação de biodiesel no sector dos transportes em Portugal (6)

## 1.2 Biodiesel: produção, características e vantagens

A definição dada ao biodiesel é que este é um “éster metílico produzido a partir de óleos vegetais ou animais, com qualidade de combustível para motores diesel, para utilização como biocombustível” (4). Para se produzir biodiesel, é necessário realizar um processo de transesterificação que consiste numa reacção entre um triglicerídeo, principal constituinte dos óleos e gorduras, e um álcool, na presença de um catalisador, originando glicerol e biodiesel (Figura 9).

Nesta reacção, uma mol de um triglicerídeo reage com três moles de álcool na presença de um catalisador, que tanto pode ser ácido como alcalino (embora a reacção seja mais rápida em meio alcalino), formando uma mol de glicerol e três moles de uma mistura de ésteres de ácidos gordos (12).

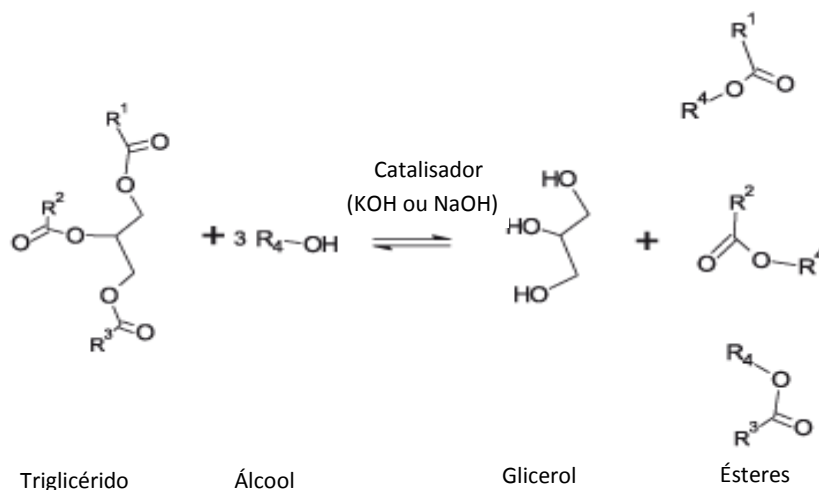


Figura 9 - Reação de transesterificação (13)

No fim do processo, ocorre a separação de fases, pois o glicerol é imiscível no biodiesel, permitindo assim a remoção do glicerol para utilização noutras aplicações (14), e do biodiesel para utilização como substituto ou aditivo do gasóleo.

Os ácidos gordos presentes no biodiesel, R1, R2 e R3 nos ésteres (Figura 9), relacionam-se com a composição do triglicérido, e são estes que definem a composição química do biocombustível. Os ácidos gordos que se encontram em algumas das matérias-primas para a produção de biodiesel de 1ª geração são enumerados na tabela seguinte (Tabela 2):

Tabela 2 – Composição em ácidos gordos (%) de culturas típicas para a produção de biodiesel (15)

| Ácido gordo          | Canola | Palma | Soja | Girassol | Milho | Côco | Gordura |
|----------------------|--------|-------|------|----------|-------|------|---------|
| Capróico (C6:0)      |        |       |      |          |       | 1    |         |
| Caprílico (C8:0)     |        |       |      |          |       | 7    |         |
| Cáprico (C10:0)      |        |       |      |          |       | 7    |         |
| Láurico (C12:0)      |        |       |      |          |       | 47   |         |
| Mirístico (C14:0)    |        | 1     |      |          |       | 18   | 2       |
| Palmítico (C16:0)    | 4      | 45    | 11   | 5        | 11    | 9    | 25      |
| Palmitoleico (C16:1) |        |       |      |          |       |      | 8       |
| Estearico (C18:0)    | 2      | 4     | 4    | 5        | 28    | 3    | 6       |
| Oléico (C18:1)       | 61     | 39    | 23   | 29       | 58    | 6    | 41      |
| Linoleico (C18:2)    | 22     | 11    | 54   | 58       | 1     | 2    | 18      |
| Linolénico (C18:3)   | 10     |       | 8    | 1        |       |      | 1       |
| Araquídico (C20:0)   |        |       |      |          |       |      |         |
| Eicosanóico (C20:1)  | 1      |       |      |          |       |      |         |
| Behénico (C22:0)     |        |       |      | 1        |       |      |         |

Após a conversão dos óleos em biodiesel, é necessário fazer o controlo da qualidade ao produto final, para verificar se este se encontra dentro dos limites estabelecidos na norma EN14214:2012 para os vários parâmetros (Tabela 3), de forma a vir a ser utilizado como biocombustível.

Tabela 3 – Propriedades técnicas do biodiesel (16)

| Propriedades                               | Mínimo   | Máximo |
|--|----------|--------|
| Teor de éster % (m/m)                      | 96,5     | -      |
| Massa volúmica a 15 °C (g/mL)              | 0,86     | 0,90   |
| Viscosidade a 40 °C (mm <sup>2</sup> /s)   | 3,50     | 5,00   |
| Ponto de inflamação (°C)                   | 101      | -      |
| Teor em enxofre (mg/kg)                    | -        | 10,0   |
| Número de cetano                           | 51,0     | -      |
| Cinzas sulfatadas % (m/m)                  | -        | 0,02   |
| Teor de água % (mg/kg)                     | -        | 500    |
| Contaminação total (mg/kg)                 | -        | 24     |
| Corrosão à lâmina de cobre (3h a 50°C)     | Classe 1 |        |
| Estabilidade à oxidação, 110°C (h)         | 8        | -      |
| Índice de acidez (mg KOH/g)                | -        | 0,50   |
| Índice de iodo (g iodo/100g)               | -        | 120    |
| Éster metílico do ácido linolénico % (m/m) | -        | 12,0   |
| Ésteres metílicos polinsaturados % (m/m)   | -        | 1      |
| Metanol % (m/m)                            | -        | 0,20   |
| Monoglicéridos % (m/m)                     | -        | 0,70   |
| Diglicéridos % (m/m)                       | -        | 0,20   |
| Triglicéridos % (m/m)                      | -        | 0,20   |
| Glicerol livre % (m/m)                     | -        | 0,02   |
| Glicerol total % (m/m)                     | -        | 0,25   |
| Metais do grupo I (Na+k) (mg/kg)           | -        | 5,0    |
| Metais do grupo I (Na+k) (mg/kg)           | -        | 5,0    |
| Fósforo (mg/kg)                            | -        | 2,0    |

O biodiesel pode ser utilizado na forma pura, também conhecido por B100, ou em misturas em diversas percentagens com o gasóleo comum que, dependendo da percentagem da mistura, são designados por B2, B5 ou B20 correspondendo, respectivamente, à adição de 2%, 5% ou 20% de biodiesel ao gasóleo (16).

O biodiesel apresenta diversas vantagens face ao gasóleo fóssil, sendo possível enumerar uma série de aspectos a nível de propriedades físico-químicas, económicas e ambientais (Tabela 4).

Tabela 4 – Vantagens e desvantagens do biodiesel (12) (17) (18)

| Vantagens   | Desvantagens   |
|---|--|
| Não contém enxofre  | Poder calorífico inferior ao gasóleo   |
| Lubricidade elevada (combustão mais eficiente)              | Potência ligeiramente inferior   |
| Maior tempo de vida do motor                                | Origina depósitos acumulados no reservatório e condutas                                    |
| Efeito de limpeza de componentes do motor                   | Incompatibilidade com alguns materiais (PVC, poliestireno, cobre, chumbo, ferro)           |
| Ponto de inflamação elevado 157-182 °C (baixa volatilidade) | Dificuldades de assimilação da glicerina   |
| Índice de cetano elevado (boa qualidade de ignição)         | Subida de preços de matérias-primas usadas na alimentação e áreas de ocupação para cultivo |
| Menor consumo   | Aumento das emissões de NOx  |
| Sustentabilidade energética e independência externa         |  |
| Biodegradável   |  |
| Reciclagem de resíduos vegetais ou animais                  |  |
| Redução das emissões de GEE e matéria particulada           |  |

### 1.3 Microalgas

As microalgas são dos organismos mais robustos e são capazes de crescer em condições adversas, encontrando-se geralmente em lugares húmidos ou em zonas de água (19). Também são os organismos que mais oxigénio fornece ao planeta, podendo ser usados na mitigação dos GEE, pela grande capacidade de assimilação de CO<sub>2</sub>, resultante do processo de queima dos combustíveis fósseis e de práticas agrícolas impróprias (20). As microalgas crescem naturalmente em todo o mundo. Em condições apropriadas, podem crescer intensivamente, de forma quase ilimitada. O seu cultivo é relativamente simples e podem ser manipuladas para se desenvolverem em grandes quantidades sem alterar *habitats* ou fontes de alimento, pelo que é muito fácil satisfazer as necessidades das algas, pois tudo o que precisam para se desenvolver é de água, luz e dióxido de carbono.

As microalgas possuem um dos mais eficientes sistemas fotossintéticos de conversão de energia solar em compostos orgânicos sendo que muitas espécies crescem muito mais rapidamente do que as plantas terrestres. Isso possibilita maiores rendimentos anuais e maior produtividade de biomassa. Assim como na agricultura, a utilização das microalgas em biotecnologia obedece aos mesmos pressupostos que serviram de base à agricultura terrestre, ou seja, usar a capacidade fotossintética com o objectivo de produzir biomassa.

O potencial das microalgas é vasto e diversificado (Figura 10) e há uma procura por parte de laboratórios em ajudar na solução de questões críticas na área de saúde, nutrição, cosmética, ambiente e energia, muito importantes para a humanidade nos dias que correm.

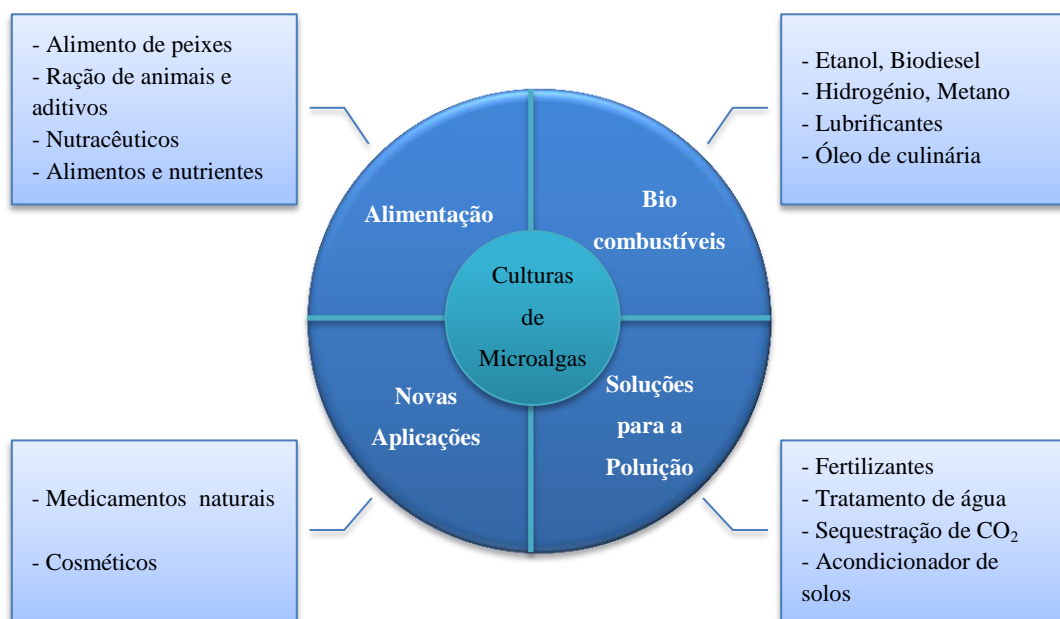


Figura 10 - Aplicações industriais das microalgas (21)

Actualmente, as microalgas têm aplicação como tratamento de águas residuais de processos industriais, na descontaminação biológica e remoção de metais pesados bem como bioindicadores na detecção de nutrientes e substâncias tóxicas como detergentes, efluentes industriais, herbicidas, etc. (22) (23) (24).

Também na agricultura a biomassa microalgal pode ter um contributo importante. Os métodos agrícolas actuais comprometem grandes extensões de terra o que, por consequência, pode originar o esgotamento dos solos. O uso de pesticidas e herbicidas provocam contaminação das águas e, quando praticado de forma desregrada e extensiva, origina a conversão de regiões de floresta em desertos e alterações climáticas. A biomassa de microalgas pode ser utilizada como biofertilizante do solo, mantendo as propriedades naturais deste e não correndo o risco de contaminar cursos de água (25).

Outras aplicações comerciais são o fabrico de produtos de valor acrescentado para suplementos nutricionais na alimentação, corantes naturais e ácidos gordos polinsaturados, aditivos para produção de ração animal devido à rica composição química das microalgas; podem ser incorporadas em cosméticos e têm ainda um papel crucial na aquacultura (26).

Uma outra aplicação relevante e que tem suscitado muito interesse nos últimos anos, é o uso das microalgas como alternativa energética ao petróleo, capaz de produzir vários vectores energéticos como o hidrogénio, biocombustíveis líquidos (biodiesel e etanol) e ainda biogás (metano) (Figura 13). De facto, muito do petróleo existente tem origem na decomposição de algas com centenas de milhões de anos. As indústrias apostam cada vez mais na área de biocombustíveis à base de microalgas, pois estas oferecem um rendimento satisfatório em curto espaço de tempo (27) (28).

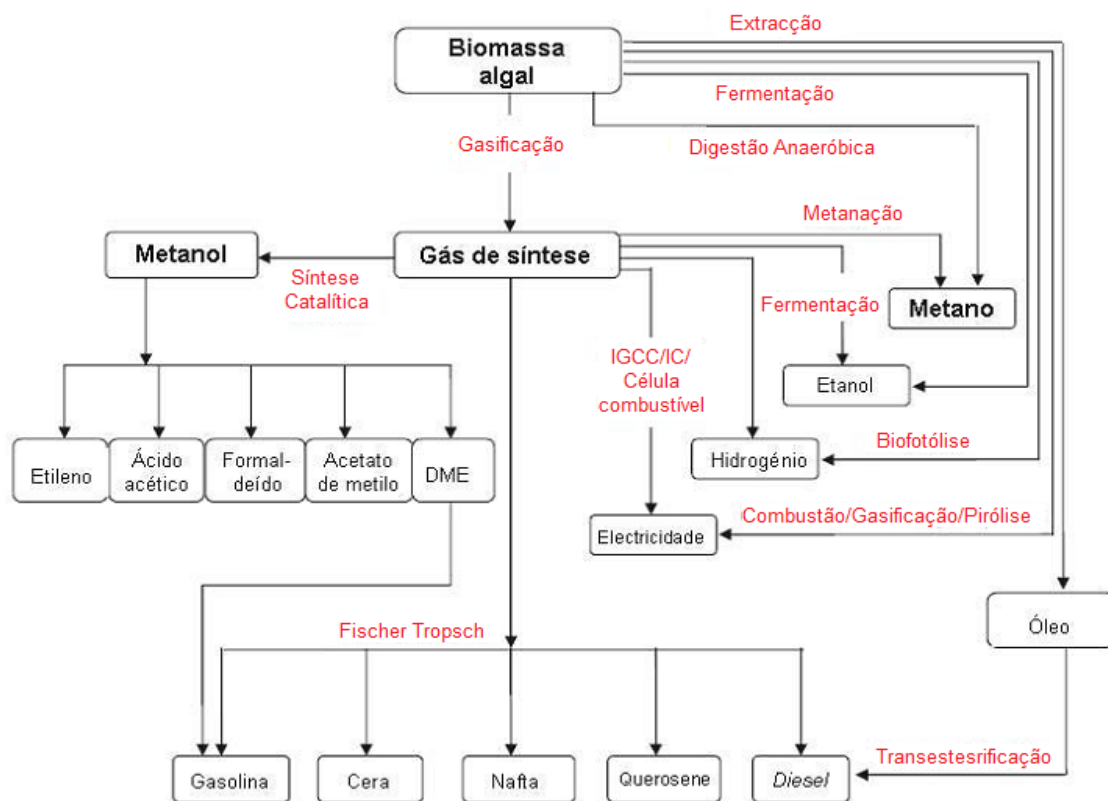


Figura 11 - Processos de obtenção de produtos energéticos derivados de microalgas (29)

### 1.3.1 Potencial para produção de biodiesel

Muita investigação tem sido realizada na procura de culturas mais adequadas como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel, assim como no melhoramento e optimização dos processos e tecnologias com vista ao aumento do rendimento da extracção do óleo contido nessas matérias-primas. Mantendo os rendimentos actuais, quantidades abismais de terra e água potável (para combustíveis de 1ª geração), seriam necessárias para produzir óleo suficiente que substituísse completamente o uso de combustíveis fósseis.

Nalguns países menos desenvolvidos, o aumento do preço do óleo vegetal está a tornar-se num problema que necessita de especial atenção. Uma das soluções é produzir combustível a partir de óleos vegetais não alimentares, como camelina ou *jatropha* que podem prosperar em terras inférteis e marginais, onde muitas árvores e plantas não crescem.

Uma outra alternativa é produzir biodiesel a partir de óleo produzido por algas, situação que não implica a deslocação de terras usadas actualmente para a produção de alimentos e possibilita, ainda, a criação de novos empregos na aquacultura. As grandes vantagens destes biocombustíveis produzidos a partir das algas é que estas não competem com culturas alimentares nem necessitam de água potável. Aliás, os efluentes de estações de tratamento de esgotos são ideais para cultivar algas para biocombustível, porque estas são organismos robustos e altamente adaptáveis a quase todos os ambientes (30).

As algas podem ser cultivadas numa variedade de condições e ambientes dos mais diversificados e imagináveis. Lagoas, canais rasos, bioreactores horizontais e verticais, sacos de plásticos e sistemas abertos são alguns dos recipientes e dispositivos utilizados no cultivo de algas. Podem-se desenvolver ou ser adaptadas nas condições mais adversas, como desertos, salinas ou água salobra, e ainda aproveitando efluentes de estações de tratamento de esgoto.

Além disso, nenhum gás de efeito estufa ou poluição é emitido por algas e não é exigida a utilização de herbicidas, pesticidas ou fertilizantes para o crescimento. As algas podem ser um instrumento importante no sequestro de CO<sub>2</sub> produzindo, consequentemente, oxigénio como subproduto. Indústrias que produzam algas podem ser colocadas junto das indústrias que produzem intensivamente CO<sub>2</sub> e outros gases.

Após identificação das espécies de algas com características desejáveis para a indústria energética, as mais produtivas podem oferecer mais de 130 mil litros de óleo por hectare ao ano em óptimas condições, ao contrário das culturas convencionais (Figura 12) (31).

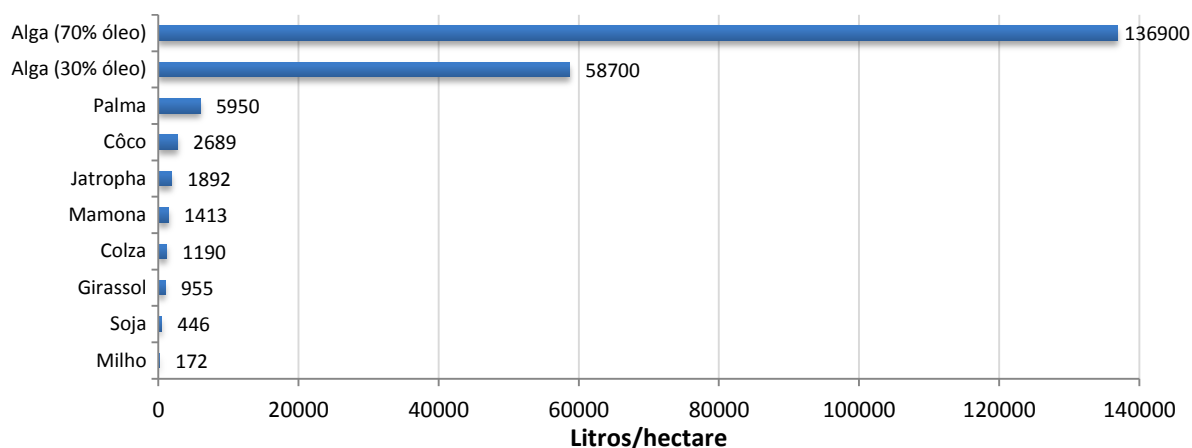


Figura 12 - Produção de óleo a partir de diferentes culturas (31)

Naturalmente que, comparando estas diferenças do conteúdo de óleo de cada matéria-prima, é fácil perceber que a percentagem de ocupação de terras para a produção de biodiesel é também muito diferente. Assim, sabendo quantos litros de óleo cada cultura iria produzir, é possível chegar à conclusão que, para a obtenção da mesma quantidade de óleo, a produção de milho iria necessitar cerca de 2,5 vezes mais de terrenos que a soja, cerca de 5,5 vezes mais que o girassol e cerca de 330 vezes mais do que as microalgas com 30% de teor de óleo.

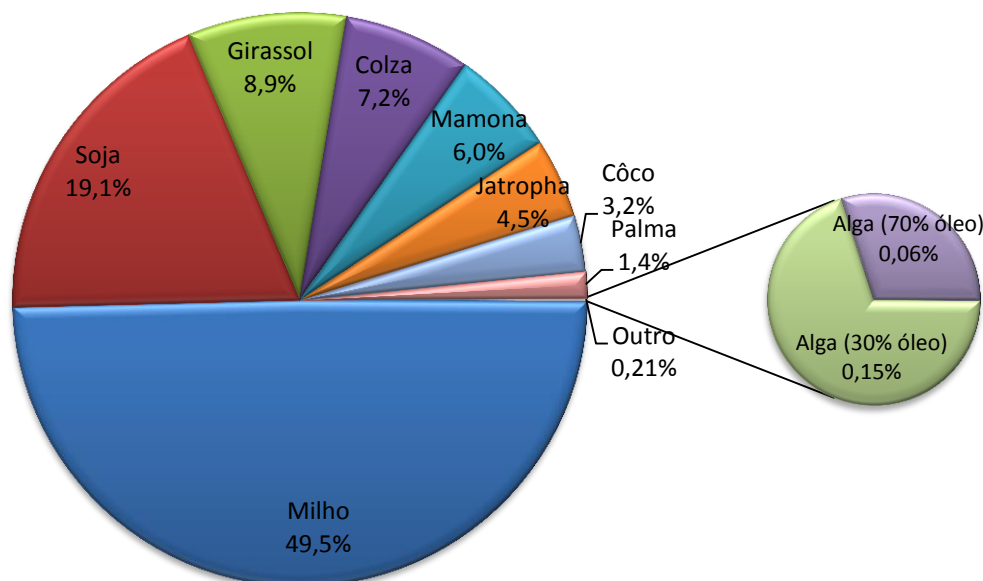


Figura 13 - Percentagens de ocupação de terrenos para as diferentes culturas, para obtenção da mesma quantidade de óleo (11)

A percentagem de lípidos presente nas microalgas varia consoante o tipo de alga, podendo haver conteúdos oleaginosos da ordem dos 75% (Tabela 5). Esta constituição das microalgas fazem delas excelentes fontes de matéria-prima para a produção de biodiesel.

Tabela 5 – Percentagem de óleo de diferentes espécies de microalgas (31)

| Espécies de Microalgas (Figura 14) | Conteúdo Oleaginoso (% peso seco) |
|------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Botryococcus braunii</i>        | 25 – 75                           |
| <i>Chlorella</i> sp.               | 28 – 32                           |
| <i>Nannochloropsis</i> sp.         | 31 – 68                           |
| <i>Neochloris oleoabundans</i>     | 35 – 54                           |
| <i>Nannochloris</i> sp.            | 20 – 35                           |
| <i>Schizochytrium</i> sp.          | 50 – 77                           |

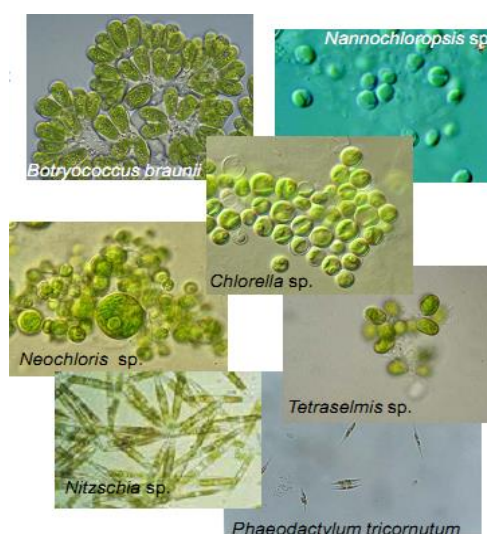


Figura 14 - Diferentes espécies de microalgas (32)



### 1.3.2 Métodos de produção

Encontrar espécies de microalgas aptas para crescerem não é difícil, no entanto, cultivar espécies específicas para a produção de biodiesel não é fácil, pois possuem características igualmente específicas e exigem cuidados especiais, como evitar a contaminação por outras espécies de microalgas indesejáveis que estejam presentes no meio de cultivo. Por isso, é necessário avaliar antecipadamente determinados factores que irão influenciar o desenvolvimento das microalgas para se atingir níveis satisfatórios de culturas com elevado teor em óleo. Assim, os bioreactores utilizados no cultivo de microalgas podem ser de dois tipos: os tanques abertos ou sistemas fechados de fotobioreactores.

Os sistemas comumente utilizados são pouco sofisticados, por estarem a céu aberto, sob condições naturais de iluminação e temperatura, e com baixo ou nenhum controlo sobre esses factores ambientais (33). Os tanques abertos conhecidos por *raceways ponds*, podem ser tanques alongados ou tanques circulares com pás giratórias no centro. A profundidade destes tanques deve estar entre 15 a 30 cm, para que seja possível a incidência de luz nas células de forma adequada. A agitação é feita através de pás giratórias ou injeção de ar e permite à água e aos nutrientes circularem constantemente, garantindo a mistura e suspensão das microalgas na água. Esta operação nos tanques é contínua com CO<sub>2</sub> e nutrientes a serem constantemente fornecidos.



Figura 15 - Sistema de tanques abertos, *raceway ponds* (34) (35)

O principal problema no cultivo das espécies de microalgas com maior teor de óleo em sistemas abertos, é que estas não são necessariamente as de crescimento mais rápido (36) (37).

O crescimento em lagoas exteriores tem as suas limitações e dificuldades, devido à falta de controlo em factores como a baixa densidade celular, a contaminação por outros microorganismos, a temperatura da água, as condições de CO<sub>2</sub> e de radiação (Tabela 5), o que faz com que o crescimento da cultura esteja dependente da localização geográfica e limitada aos meses mais quentes, com a excepção das zonas de clima tropical (38). Uma variação possível no sistema básico aberto é cobrir a superfície dos reservatórios com uma estufa (Figura 16), de forma a minimizar estas desvantagens, e abrangendo um maior número de espécies que podem ser cultivadas, obtendo melhor controlo sobre a temperatura e introdução de CO<sub>2</sub> no ambiente da estufa, aumentando a produtividade e velocidade de crescimento das microalgas (37).



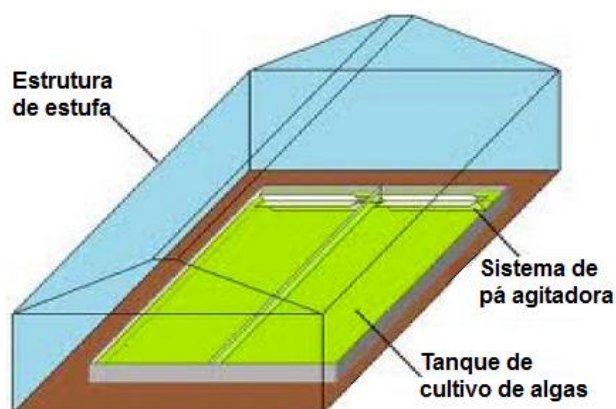


Figura 16 - Sistema de tanques com cobertura (39)

Para evitar alguns desses problemas é necessário recorrer a fotobioreactores fechados para conseguir atingir níveis de concentração de biomassa máximos e de boa qualidade. Nos sistemas fechados, é usado o formato em cilindros, serpentinas, espirais ou painéis de forma achatada, construídos com tubos de plástico, vidro ou policarbonato (Figuras 17 e 18). Recorrendo a este sistema é possível controlar as condições de cultivo como a quantidade dos nutrientes, a temperatura, a iluminação, o pH (38), o que conduz a maiores produtividades e viabiliza a produção comercial de uma série de compostos de valor acrescentado (40). Estes fotobioreactores também podem ser estrategicamente implantados próximo de centrais industriais poluidoras (ex. centrais termoelectricas e cimenteiras) para o aproveitamento do CO<sub>2</sub> proporcionando melhores condições para o melhor desenvolvimento da cultura de microalgas.



Figura 17 - Sistemas de fotobioreactores fechados (41) (42)

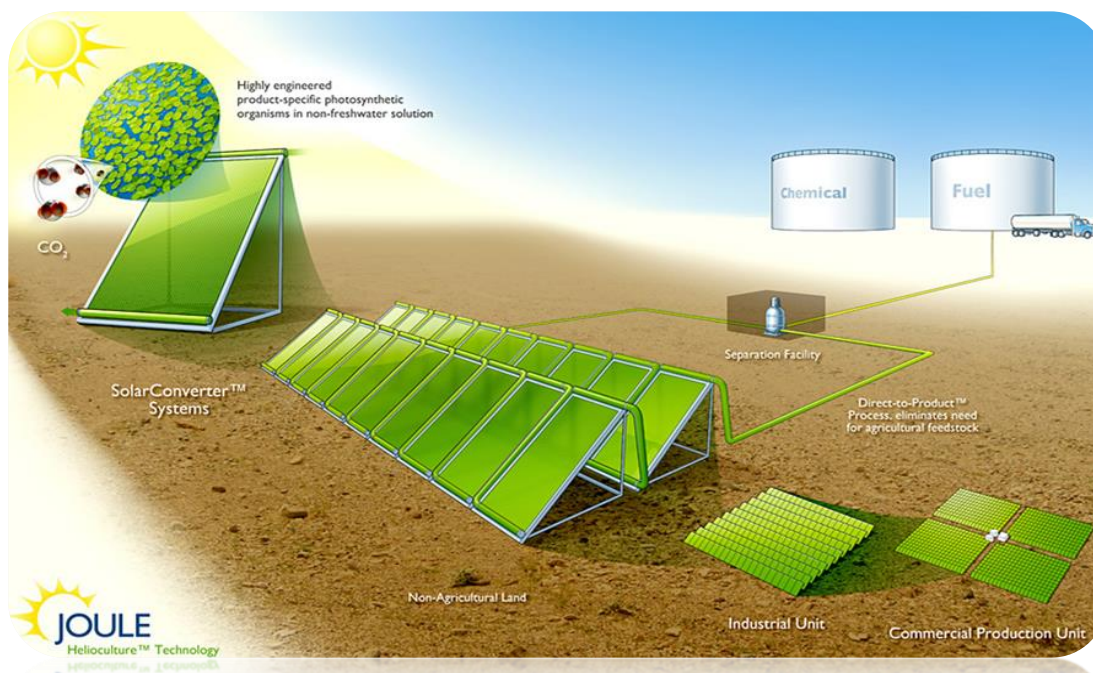


Figura 18 - Exemplo de central de produção de microalgas para biocombustível (43)

A produção de biodiesel a partir de óleo de microalgas exige cultivos destas em grande escala, dimensionados para o máximo aproveitamento de radiação e sistemas de captação de efluentes, que podem reduzir o custo de produção por unidade de área. Os custos de operação de um fotobioreactor são superiores aos de tanque aberto, mas a eficiência e rendimentos em óleo são significativamente maiores, pelo que se consegue amortizar os custos iniciais em médio ou longo prazo (Tabela 6) (33). Os tipos e *designs* dos bioreactores para cultivo em grande escala de microalgas representam um compromisso entre os custos do investimento em relação aos retornos esperados e também entre os esforços para o estabelecimento de condições óptimas para a obtenção máxima de produtividade (44).

Tabela 6 – Comparação entre sistemas abertos e fechados (45)

| Parâmetros               | Tanque Aberto | Fotobioreactor |
|--------------------------|---------------|----------------|
| Iluminação               | Razoável      | Excelente      |
| Controlo de temperatura  | Nenhum        | Excelente      |
| Transferência de gás     | Baixo         | Médio          |
| Produção de oxigénio     | Baixo         | Elevado        |
| Controlo de espécies     | Nenhum        | Elevado        |
| Controlo de contaminação | Baixo         | Elevado        |
| Custos                   | Baixo         | Elevado        |
| Produção volumétrica     | Elevado       | Baixo          |

### 1.3.3 Factores de crescimento

Há vários factores que influenciam o crescimento dos organismos vivos, e no caso das microalgas quando se procura a sua máxima eficiência de produção e desenvolvimento, os factores mais determinantes são a radiação, a temperatura, a agitação, a presença de CO<sub>2</sub> e o pH.

A radiação luminosa aproveitada pelas plantas situam-se numa faixa de 400 a 700 nm (radiações fotossinteticamente activas), correspondendo a cerca de 50% da radiação solar, numa faixa de intensidade de 800 a 1000 W/m<sup>2</sup>. Os pigmentos fotossintéticos são substâncias capazes de absorver a

luz visível no processo de fotossíntese existindo três tipos de pigmentos fotossintéticos nas algas: as clorofilas (a, b, c e d), os carotenóides (carotenos e xantofilas) e as ficobilinas (ficoeritrina e ficocianina). As clorofilas são pigmentos fotossintéticos de cor verde e ocorrem em todos os eucariontes fotossintéticos e nas cianobactérias. No grupo dos carotenóides, os carotenos têm cor alaranjada, surgindo em todos os organismos fotossintéticos, com excepção das bactérias. As xantofilas, pigmentos de cor amarela, encontram-se nas algas castanhas e nas diatomáceas. As ficobilinas surgem nas algas vermelhas e nas cianobactérias, sendo a ficobilina um pigmento de cor avermelhada e a ficocianina azul (46).

A temperatura influencia as taxas de reacções celulares e afecta também a natureza do metabolismo, a concentração e composição da biomassa e ainda as necessidades nutricionais (47).

A agitação facilita a homogeneização dos nutrientes evitando a sedimentação das microalgas, sendo que as trocas gasosas entre as partículas e o meio também são facilitadas.

O fornecimento de ar é um factor importante para a homogeneização dos nutrientes e para evitar a sedimentação das microalgas. Em cultivos de grande escala é recomendada a injeção de CO<sub>2</sub> para contribuir para o processo de fotossíntese. O crescimento de microalgas está directamente relacionado com a taxa de fixação de CO<sub>2</sub> e utilização de energia luminosa. A concentração de O<sub>2</sub> nos tanques de cultura representa um parâmetro para se controlar a actividade fotossintética das microalgas, sendo que a concentração de O<sub>2</sub> aumenta quando a fotossíntese também aumenta (48). A injeção de ar nas culturas proporciona uma difusão eficiente dos nutrientes, cria uma estabilidade do pH, mantém as microalgas em suspensão e o cultivo é distribuído uniformemente (44).

O pH do meio de cultivo determina a solubilidade do CO<sub>2</sub> e minerais no meio, influenciando assim o metabolismo das algas. A variação do pH em culturas de microalgas ocorre devido ao consumo de substratos, solubilização e consumo do CO<sub>2</sub> e à degradação de metabolitos produzido (49). Assim que as microalgas conseguem metabolizar o carbono inorgânico do CO<sub>2</sub>, há uma tendência de aumento do pH. Vários estudos indicam que em meios de cultura com limitação na disponibilidade de determinados nutrientes, ocorre um aumento do teor de lípidos em determinadas algas (50) (51).

#### **1.3.4 Métodos de colheita**

O grande desafio actual na produção dos biocombustíveis consiste na optimização dos processos de produção, colheita e extracção dos óleos e na identificação e manipulação dos recursos biológicos com maior potencial de exploração, visando a valorização desta potencial fonte energética (52) (53).

A principal dificuldade do cultivo artificial de microalgas é a baixa concentração de biomassa atingida. A energia necessária durante a produção de microalgas é elevada e geralmente ultrapassa a energia aproveitável da sua biomassa (54). Para ser viável o uso das microalgas como matéria-prima para biocombustíveis, o custo e a eficiência energética dos processos envolvidos têm de ser melhorados drasticamente.

Devido ao seu pequeno tamanho (cerca de 2 a 4 micrómetros) e baixa concentração no meio da cultura (0,5 – 2 g/L em tanques abertos e cerca de 5 – 10 g/L em fotobioreactores) a colheita da biomassa é a que representa maiores desafios, pois o processo de separação é difícil e dispendioso. A técnica que se escolhe para a colheita depende da espécie de microalga e do produto final pretendido, sendo que as características que simplificam o processo são as de células maiores mais fáceis de sedimentar comparativamente ao meio de cultura e que se autofloculem mais facilmente. O processo mais comum é a centrifugação, que requer um consumo intensivo de energia, representando a maior fracção do total de energia necessária. Se a microalga pudesse ser pré-concentrada em cerca de 30 a 50 vezes por outras técnicas antes da centrifugação, a energia exigida seria reduzida de forma abismal (55) (56) (57).

Há inúmeras técnicas para a colheita de microalgas do seu meio de cultura, e estas incluem a centrifugação, a floculação e a flotação com coagulantes, a filtração, entre outras (Figura 19). Grande

parte destas técnicas tem várias desvantagens não só pelos custos elevados associados ao processo, mas também pela baixa eficiência de separação e contaminação da biomassa colhida (58).

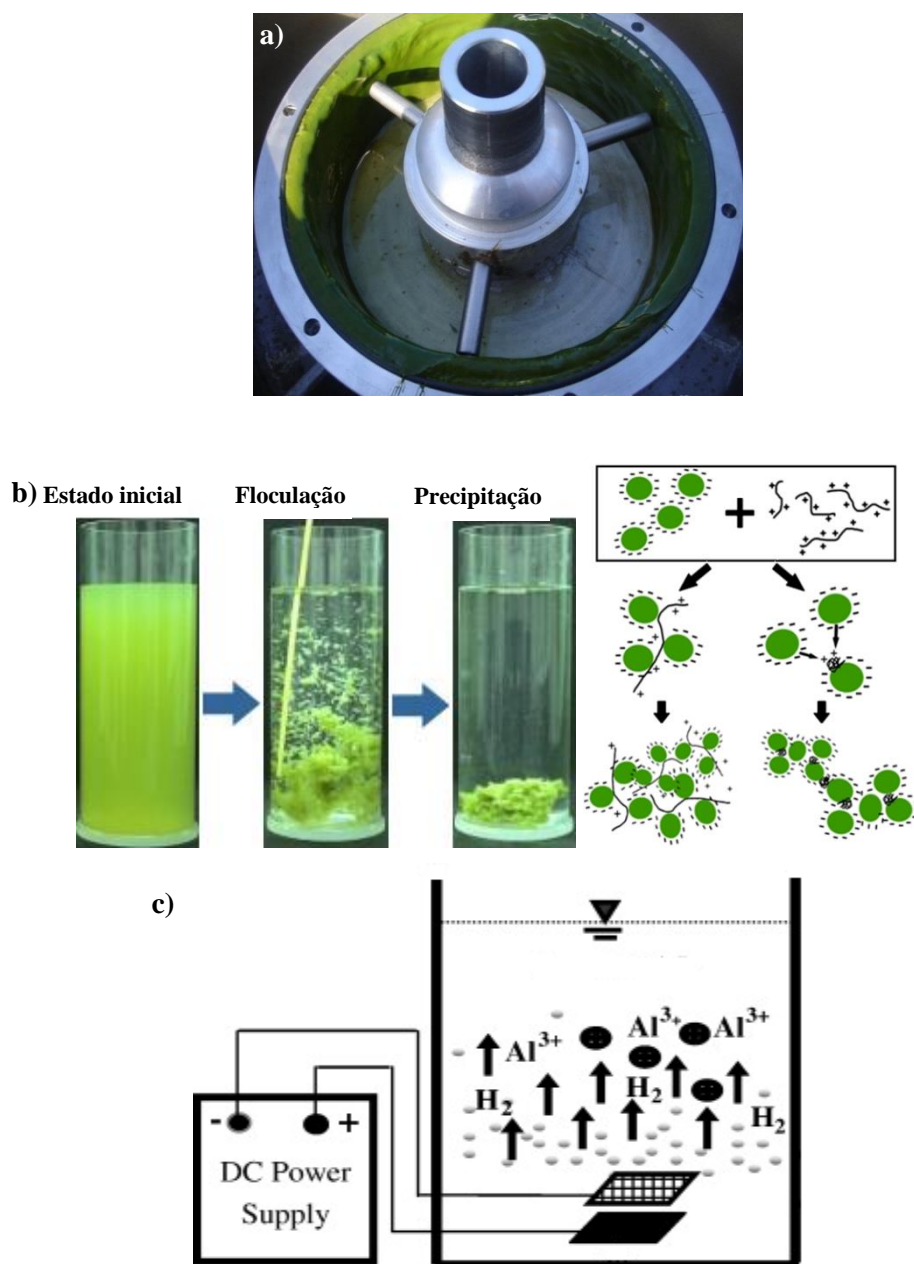


Figura 19 - Técnicas de colheita: a) Centrifugação; b) Floculação e interação entre microalgas e floculantes; c) Electroflotação (59) (60) (61) (62)

Na Tabela 7 apresentam-se as principais características das várias técnicas de colheita, o rendimento e a energia gasta em cada processo, bem como as vantagens e desvantagens de cada uma.

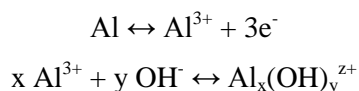
Tabela 7 – Características de diferentes técnicas de colheita (56)

| Processo de Colheita    | Rendimento  | Energia                               | Fiabilidade   | Limitações  |
|-------------------------|---|---------------------------------------|---------------|---|
| Floculação              | > 95% remoção de microalga  | Baixa para agitação fraca             | Muito boa     | Floculantes podem ser dispendiosos e pode causar contaminação |
| Centrifugação           | > 22% sólidos suspensos totais; 80-90% transparência; > 95% colheita de células | Elevada, 8kWh/m <sup>3</sup>          | Muito boa     | Elevada energia consumida                                     |
| Sedimentação Gravitica  | 0.5-1.5% sólidos suspensos totais   | Baixa, 0.1kWh/m <sup>3</sup>          | Fraca         | Processo lento  |
| Filtração (natural)     | 1-6% sólidos suspensos totais   | Baixa, 0.4kWh/m <sup>3</sup>          | Boa           | Filtros precisam de ser substituídos periodicamente           |
| Filtração (sob pressão) | 5-27% sólidos suspensos totais  | Média, 0.88kWh                        | Muito boa     | Filtros precisam de ser substituídos periodicamente           |
| Floculação-Flotação     | 1-6% sólidos suspensos totais; 90% remoção de microalga                         | Alta, 10-20kWh/m <sup>3</sup>         | Boa-Muito boa | Eléctrodos precisam de ser substituídos periodicamente        |
| Electrocoagulação       | > 95% remoção de microalga  | Média-alta, 0.8-1.5kWh/m <sup>3</sup> | Muito boa     | Eléctrodos precisam de ser substituídos periodicamente        |
| Electroflotação         | 3-5% sólidos suspensos totais   | Elevada                               | Muito boa     | Eléctrodos precisam de ser substituídos periodicamente        |
| Electrofloculação       | > 90% remoção de microalga  | Baixa-média, 0.33kWh/m <sup>3</sup>   | Muito boa     | Eléctrodos precisam de ser substituídos periodicamente        |

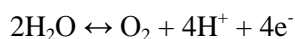
A electrocoagulação é uma técnica de separação de biomassa através da electrólise, que apresenta variadas vantagens em relação às técnicas convencionais, embora somente tenha sido testada em pequena escala até ao momento (Figura 20). Não deve ser confundida com a electroflotação que utiliza também a electrólise, para produzir bolhas de gás que fazem elevar as partículas floculadas para a superfície, mas os eléctrodos são colocados horizontalmente, na base do tanque de flotação, e o efeito de floculação decorre posteriormente com o uso de floculantes (63) (64). Ao contrário desta técnica, a electrocoagulação, não usa floculantes e os eléctrodos são colocados na vertical.

No tratamento de águas residuais, a electrocoagulação (por electrólise) tem sido considerada como a melhor alternativa aos coagulantes químicos (65). Comparativamente à floculação com sais de Fe<sup>3+</sup> ou Al<sup>3+</sup>, a electrocoagulação traz a vantagem de não introduzir aniões de cloreto e sulfato na água.

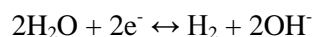
Durante a electrólise ocorrem as seguintes reacções, no ânodo:



Os hidróxidos de alumínio formados na electrólise têm grande variação, o que é influenciado fortemente pelo pH (66). A água sofre também oxidação e ocorre a libertação de oxigénio:



A reacção de redução que ocorre no cátodo forma hidrogénio:





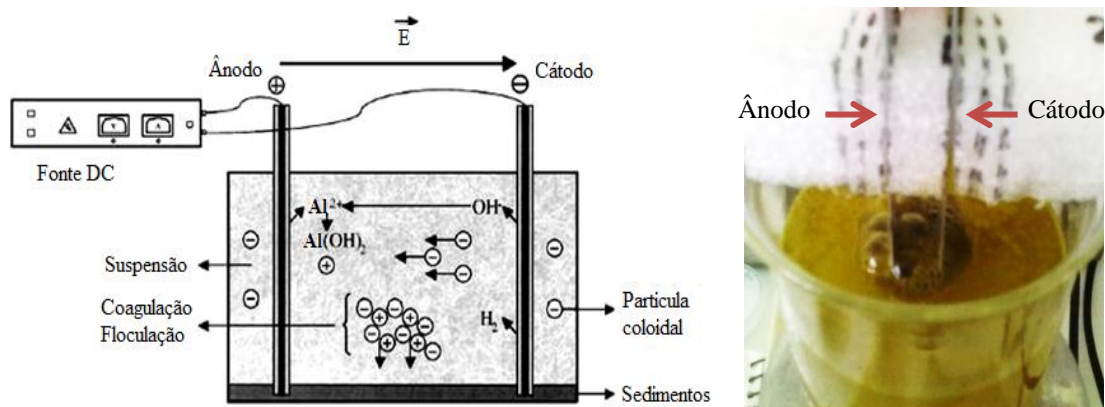


Figura 20 - Esquema de montagem para electrocoagulação

O princípio desta técnica baseia-se no movimento das partículas carregadas electricamente num campo eléctrico. A superfície das células da microalga está carregada negativamente causando a atracção para o ânodo durante a electrólise das partículas em suspensão. Assim que entram em contacto com o ânodo, os hidróxidos de metal solúveis carregados positivamente, agregam-se à superfície negativa da célula da microalga e destabilizam a suspensão através de neutralização da carga. Os hidróxidos de metal insolúveis destabilizam a suspensão de microalga, resultando na agregação da microalga e precipitados insolúveis (67). Esta destabilização ocorre mais rapidamente com o uso de eléctrodos de alumínio do que de ferro e os hidróxidos de alumínio são coagulantes bastante mais eficientes do que os de ferro.

Como a electrólise da água produz gases de hidrogénio e oxigénio nos eléctrodos, as bolhas de oxigénio do ânodo sobem à superfície elevando consigo flocos de alga agregados, pelo que leva à flotação da biomassa sem a adição de químicos floculantes (64).

No caso deste estudo, bem como em investigações realizadas por outros autores (68), foram usados eléctrodos de alumínio nas experiências, pois este material não sofre uma corrosão excessiva como os de ferro. É no entanto de ter em conta as incrustações que podem ocorrer no cátodo provocando uma redução de intensidade de corrente devido à resistência nos eléctrodos por deposição de iões de cálcio e magnésio presentes na água. Com a electrólise não há o risco de contaminação da biomassa com floculantes químicos, podendo, no entanto haver alguma libertação dos iões presentes no eléctrodo (69). Como a lei de Faraday prevê, a concentração de alumínio tanto na biomassa como no meio sobrenadantes aumenta com o tempo e densidade de corrente (56). Apesar de ser um material mais vantajoso para a utilização na electrólise, não deixa de haver libertação de alumínio no meio. A sua concentração pode ser diferente consoante seja utilizado em água doce ou água salgada, pois esta sofre influência com a composição química do meio. A água salgada contém elevadas concentrações de aniões de sulfato, pelo que facilitam a precipitação dos hidróxidos de alumínio (70). A água salgada também contém elevadas concentrações de catiões de magnésio e cálcio. A libertação de aniões de hidroxilos no cátodo pode levar a um aumento do nível do pH junto do mesmo. Isto dá origem à precipitação de carbonatos e hidróxidos de cálcio e magnésio (71) (72). Os níveis de alumínio tanto na biomassa como no sobrenadante, podem ser minimizados usando uma densidade de corrente baixa.

O menor consumo de energia necessário para a electrocoagulação das microalgas marinhas deve-se sobretudo à alta condutividade do meio salino, resultando numa eficiência superior da libertação de alumínio do ânodo (73). Outro factor que influencia é que os iões de cloreto presentes na água marinha incidem na camada de óxido de alumínio formada na superfície do ânodo e por isso melhoram a libertação do alumínio (66).

Vários testes foram realizados utilizando esta técnica de electrólise, mas apenas na remoção de microalgas em água potável ou efluentes em densidades muito baixas comparativamente às dos sistemas de produção de microalgas, e sobretudo em água doce (74). A composição química e condutividade da água doce e salgada são muito diferentes e influenciam diferentemente o processo de

electrólise. Procura-se incidir esta técnica em microalgas marinhas pois estas apresentam-se como uma fonte atractiva de biocombustíveis, devido à sua fraca dependência de recursos de água doce.

### 1.3.5 Outras aplicações

Diversas microalgas têm sido cultivadas pela capacidade de sintetizar compostos importantes para o ser humano (Figura 14). Os seus lípidos são maioritariamente compostos por ácidos gordos contendo entre 12 a 22 carbonos, podendo ser tanto saturados quanto mono ou polinsaturados. Em algumas espécies os PUFA (*polysaturated fatty acids* – ácidos gordos polinsaturados) representam entre 25 a 60% dos lípidos totais (75). Os lípidos, especialmente das espécies de microalgas marinhas contêm quantidades elevadas de ácidos gordos polinsaturados como o AA (ácido araquidónico – 20:4n-6) também conhecido por Ómega 6, o EPA (ácido eicosapentaenóico – 20:5n-3) e o DHA (ácido docosahexaenóico – 22:6n-3), ambos conhecidos como Ómega 3. Ao EPA e DHA são atribuídas propriedades benéficas à saúde e encontram-se presentes em certos peixes marinhos. Peixes como o bacalhau, arenque, anchova, salmão e sardinha contêm uma quantidade elevada de gordura e são aproveitados na obtenção dos PUFA. Porém, a extracção destes ácidos pode ter vários problemas, como o odor desagradável, a contaminação com metais pesados, a baixa estabilidade, a presença de colesterol, a produção variável e um complexo perfil de ácidos gordos.

Nas microalgas não há este tipo de desvantagens e os ácidos gordos apresentam-se numa composição mais simples e o processo de purificação destes é facilitado (76) (77). Os PUFA têm como função a prevenção e tratamento de uma série de doenças cardiovasculares, da arteriosclerose e da arritmia, da redução da pressão arterial, da redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos no plasma, da artrite reumatóide, do cancro e são essenciais no desenvolvimento cerebral.

Os ácidos linoleico (18:2n-6, AL) e alfa-linolénico (18:3n-3, AAL), também fazem parte dos ácidos essenciais para o ser humano, pois não são produzidos pelo organismo e por isso são necessários incluir através dos alimentos ou de suplementos nutricionais (78) (79).

Ainda, a partir da biomassa de microalgas é possível extrair pigmentos carotenóides como a astaxantina, beta-caroteno, luteína, cantaxantina, etc., que apresentam propriedades terapêuticas (80). Cada espécie pode conter nas suas células entre 5 a 10 tipos de carotenóides de entre cerca de 60 tipos diferentes. Diversas espécies podem acumular grandes concentrações de beta-carotenos, astaxantina ou cantaxantina, que são as que têm maior aplicação comercial, como corantes naturais e antioxidantes (81) (82). O grande interesse comercial por estes pigmentos deve-se à capacidade que estes têm de prevenir doenças degenerativas, combatendo radicais livres e funcionando como agentes contra o cancro e estimuladores do sistema imunitário (83). Estes são preferenciais aos sintéticos pois resistem melhor ao calor, ao congelamento e apresentam boa eficiência mesmo quando aplicados em pequenas quantidades nos alimentos (84).

O beta-caroteno é um pigmento normalmente encontrado nas microalgas, bem como nas macroalgas e nas plantas. Este pigmento pode ser encontrado em fracções até aproximadamente 10% da massa seca, principalmente em espécies que crescem em elevadas concentrações de sal (85). A principal aplicação comercial tem sido como corante natural, pró-vitamina A e antioxidante, bem como prevenção de problemas cardíacos, contra o cancro e estimulação do sistema imunológico (86) (87).

A astaxantina tem sido muito utilizada na aquacultura, onde é aplicada para dar a cor avermelhada à carne do salmão cultivado (88). Por ser maioritariamente utilizada astaxantina sintética, a crescente procura deste pigmento na sua forma natural pelos vários benefícios que apresenta, é visto pelas empresas como uma boa oportunidade comercial para a produção das microalgas.

Assim, deve estudar-se o desempenho de diferentes formas de cultura, seja dentro de tanques de água do mar ou de água doce, ou ainda no interior de fotobioreactores, que evitam que as culturas sejam

contaminadas por outros microrganismos, permitindo controlar a fotossíntese de maneira mais eficiente.



## 2. Objectivo do Trabalho

Com o presente estudo, pretende-se avaliar a viabilidade do método de electrocoagulação na colheita de biomassa microalgal da espécie de microalga marinha *Nannochloropsis* sp., de forma a reduzir os custos energéticos comparativamente aos métodos tradicionalmente utilizados até à data.

Pretende-se igualmente analisar o efeito que este método tem na qualidade da biomassa, nomeadamente no teor de óleos para a produção de biodiesel e ainda nos componentes de elevado valor, os pigmentos, para produção de produtos cosméticos, farmacêuticos e/ou alimentares.

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1 Meio e condições de crescimento da microalga

A microalga *Nannochloropsis* sp. foi crescida em meio GPM modificado, contendo os seguintes nutrientes:

- 0,200g/L de  $\text{KNO}_3$
- 0,038 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- 0,034 g/L  $\text{H}_3\text{BO}_3$
- 0,030 g/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$
- 4,30 mg/L  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 1,45 mg/L  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 0,30 mg/L  $\text{ZnCl}_2$
- 0,13 mg/L  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Estes nutrientes foram adicionados a 75% de água do mar filtrada (filtro GF/C de poro com 1,2  $\mu\text{m}$ ) e a 25% de água destilada. A microalga foi cultivada num bioreactor, coluna de polietileno (PBR), com cerca de 10 L de capacidade, e com agitação permanente de bolhas de ar ( $1 \text{ mL l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ), a temperatura constante de  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  e com iluminação de 1900 lux de intensidade por lâmpadas fluorescentes (Philips TL-D 36W/54-765). Estas estavam posicionadas atrás da coluna a uma distância de 20 cm aproximadamente. A intensidade de luz foi medida à superfície do PBR.

A evolução de crescimento da cultura foi seguida através de leitura, num espectrofotómetro (Hitachi U-2000), da densidade óptica a um comprimento de onda de 540 nm (para não interferir com os pigmentos contidos na microalga). Fez-se também a determinação do peso seco através de filtração de 10 mL de cultura (filtro GF/C de poro com 1,2  $\mu\text{m}$ , anteriormente seco e devidamente pesado). O filtro foi seco em estufa para evaporar a humidade existente e colocado em exsiccador para arrefecer. Por diferença obtém-se o peso seco da cultura de microalgas.

#### 3.2 Processo de Electrocoagulação

Para realização dos testes de electroquímica foram retirados 500 mL de cultura de microalga do bioreactor de 10 L. Todos os testes foram realizados à temperatura ambiente, em copos graduados de 600 mL.

Nas amostras foram mergulhados dois eléctrodos de alumínio, colocados em paralelo e com 1 cm de distância entre eles e ligados a uma fonte eléctrica DC externa (modelo HY3005D, MASTECH) controlando e ajustando a corrente para cada experiência (de 50 mA a 500 mA). A variação de tensão ao longo do tempo foi também medida nos eléctrodos, com um multímetro (modelo RE830D, RANGE). O sistema encontrava-se montado conforme se mostra na Figura 11.



Figura 21 - Esquema de montagem para electrocoagulação

Foram testados eléctrodos com áreas de superfície diferentes:  $1 \times 7,5 \text{ cm}^2$ ,  $2 \times 7,5 \text{ cm}^2$ ,  $3 \times 7,5 \text{ cm}^2$ . A cultura foi agitada magneticamente (modelo HEIDOLFH) a uma velocidade de rotação de 150 rpm. Este processo foi repetido para diferentes tempos de electrocoagulação (mínimo de 60 seg a um máximo de 15 min). A agitação foi terminada no instante em que a corrente também foi desligada para que permitisse a sedimentação/flotação da microalga.

Para determinação da eficiência de remoção da biomassa, foram retirados cerca de 4 mL de amostra, ao fim de 30 min de repouso e ainda ao fim de 24 h. Esta recolha foi efectuada cerca de 3 cm abaixo da biomassa que se encontrasse em flotação, para medição da densidade óptica do sobrenadante e de forma cuidada para não perturbar as partículas suspensas. A densidade óptica desta amostra foi medida e comparada com a densidade óptica da amostra de controlo que não sofreu o efeito da electrólise.

A eficiência de remoção foi calculada pela expressão,

$$\frac{DO_{\text{inicial}} - DO_{\text{final}}}{DO_{\text{inicial}}} \times 100$$

sendo que  $DO_{\text{inicial}}$  é a densidade óptica da amostra de controlo (igual à inicial) sem electrocoagulação e  $DO_{\text{final}}$  é a densidade óptica da amostra após a electrocoagulação, ao fim de 30 min e 24 h de repouso, respectivamente.

Para testar a qualidade da biomassa após a sua remoção por electrocoagulação determinou-se a quantidade e qualidade de óleos e pigmentos presentes e comparou-se com os teores e perfis iniciais.

### 3.3 Tratamento da biomassa

Após a recolha da biomassa de microalga, foi necessário retirar a porção de sobrenadante remanescente, passando por um processo de secagem. Foram realizadas experiências com o processo de liofilização e de secagem em estufa, embora os dados tidos em conta neste estudo apenas foram referentes ao processo de secagem em estufa.

Para se proceder à secagem, e após terminado o processo de centrifugação para separação da biomassa do sobrenadante, colocou-se numa caixa de petri a amostra sólida obtida. A estufa foi regulada para uma temperatura de  $80^\circ \text{C}$ , e a biomassa ficou cerca de 14h a 16h a secar a uma temperatura constante, de forma a eliminar totalmente a água presente na amostra.

Finalmente, esta foi colocada no exsiccador para arrefecer, para posteriormente ser pesada e preparada para o processo seguinte de moagem.

### 3.4 Processo de extracção dos óleos

A microalga necessita de um pré-tratamento de ruptura celular antes de se poder iniciar a extracção dos óleos. Para isso foi utilizado um moinho de bolas (Retsch MM400) para quebrar as paredes das células (Figura 22) e se extrair o óleo. Uma porção de cerca de 0,5 g de biomassa seca, foi moída com 8 bolas de Ø10 mm durante 3 min e 50 seg, a uma velocidade de  $25\text{ s}^{-1}$ . Este procedimento torna a amostra mais homogénea e aumenta a área de contacto com o solvente no processo de extracção.

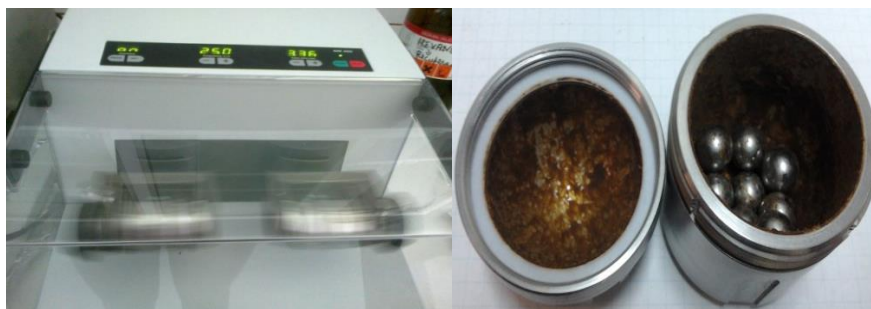


Figura 22 - Processo de moagem com moinho de bolas

Após a moagem, os óleos foram extraídos pelo método de extracção em Soxhlet, utilizando cartuchos de extracção de celulose (19x90 mm). Foi colocado 0,5 g de biomassa seca de microalgas em cada cartucho e fizeram-se ensaios em duplicado (Figura 23). Usou-se o n-hexano como solvente devido às suas propriedades apolares que o torna miscível com os óleos, igualmente apolares, que se encontram na biomassa. Assim, o conteúdo solúvel (lípidos) da biomassa é extraída para o solvente, separando-a da fase sólida insolúvel que se mantém no cartucho.

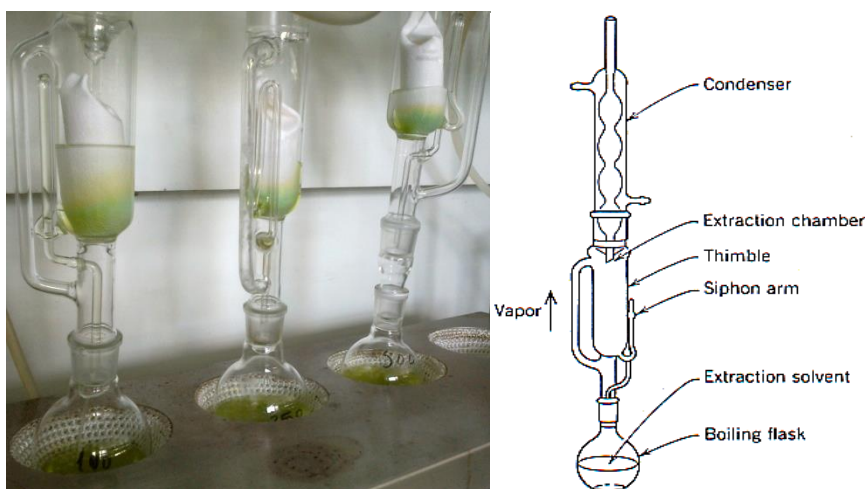


Figura 23 - Extracção de óleos em Soxhlet

O tempo ideal de extracção está predefinido para 6 h, tempo durante o qual o solvente está sob a acção do calor, numa manta de aquecimento, sendo evaporado para a câmara de extracção, condensando de seguida graças à circulação de água fria numa coluna de condensação que se encontra na parte superior do sistema. Assim, o solvente condensado, entra em contacto com a biomassa extraíndo os lípidos. À medida que o solvente que se encontra no balão evapora e condensa na parte superior onde está o cartucho contendo a amostra, o nível no sifão sobe até atingir o máximo de volume, altura em que o solvente (contendo o óleo) retorna ao balão, recomeçando assim um novo ciclo.

No fim das 6 h, o solvente que contém o óleo extraído da biomassa, tem de ser evaporado e para tal usou-se um rotavapor (Büchi Rotavapor R-200, Vacuum Controller V-800, Heating Bath B-490, Vacuum V-500). Foi utilizada uma pressão de 230 Pa e um banho termostático a uma temperatura de  $43\text{ }^{\circ}\text{C}$

para evaporar o n-hexano. Após a evaporação total do solvente (cerca de 15 a 20 min), o óleo que fica no balão é determinado gravimetricamente, tendo-se anteriormente tarado o balão utilizado.

### 3.5 Processo de extracção de pigmentos

A extracção dos pigmentos foi realizada a frio. Uma porção de cerca 10 a 15 mg de biomassa moída foi misturada com 2 mL de acetona e 1 g de bolas de vidro para moagem. Foi utilizado um agitador *vórtex* para agitar a mistura durante 1 min/amostra, mantendo as amostras no frio e repetindo-se o procedimento até a biomassa se apresentar sem cor. Posteriormente, a amostra foi centrifugada (modelo 2-6E Sartorius, SIGMA) a 3900 rpm durante 8 min e o sobrenadante recolhido. Os tubos foram envolvidos com folha de alumínio e arejados com azoto antes de serem fechados, para evitar oxidação dos pigmentos, já que estes são muito sensíveis à luz e ao oxigénio. Os tubos foram colocados no congelador, pois o calor também afecta a qualidade dos pigmentos, até posterior análise no espectrofotómetro.

### 3.6 Análise de pigmentos

A quantidade de carotenóides total foi medida no espectrofotómetro, fazendo-se um espectro de varrimento entre os comprimentos de onda de 380 nm e 700 nm. Os carotenóides foram calculados usando a equação de Lambert-Beer para equivalentes de luteína/zeaxantina e usando o coeficiente específico óptico de 234 L/(g.cm), para o comprimento de onda da absorvância máxima de luteína/zeaxantina no solvente (450 nm para todos os solventes testados).

Foi feita a identificação dos carotenóides em TLC (thin layer chromatography). Usou-se uma placa de gel de sílica, colocada previamente na estufa a 80 °C durante 1,5 h. O eluente usado era constituído por uma mistura de éter de petróleo 40-60 °C: acetona: dietilamina numa razão 10:4:1 (v/v/v), respectivamente. Esta mistura e a placa foram colocadas numa tina de vidro onde a subida do eluente vai gradualmente separando os pigmentos consoante a sua polaridade (Figura 24).

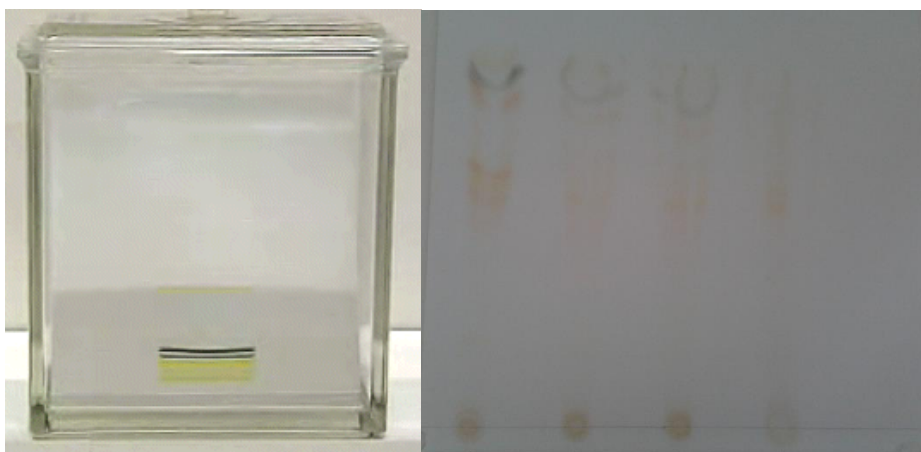


Figura 24 - Placa TLC para separação/identificação dos carotenóides

Além deste método, as amostras foram analisadas por HPLC para identificar e quantificar os principais carotenóides extraídos. O sistema HPLC (Hewlett Packard 1100 series) consiste na cromatografia líquida com detector UV/VIS ajustado para 450 nm. Usou-se uma fase móvel (metanol e 0,2% de H<sub>2</sub>O): acetonitrilo (75:25 v/v) com um fluxo de 1 mL/min numa coluna de fase reversa, 250x4,0 mm,  $\mu$ -bondapack. Padrões de astaxantina (98% Sigma), luteína (90% Sigma), trans- $\beta$ -caroteno (95% Type I, Sigma), equinenona (98% Roche) e cantaxantina (10% Roche) foram usados

para identificar os principais carotenóides, por comparação dos tempos de retenção do carotenóide da amostra com os do padrão.

### 3.7 Análise de ácidos gordos

#### 3.7.1 Preparação de ésteres metílicos dos ácidos gordos

Foi necessária a preparação de dois reagentes para este procedimento: solução metanólica de NaOH (0,3M - dissolveu-se 2 g de NaOH em 100 ml de metanol) e solução saturada de NaCl.

O ensaio consiste em submergir num banho termoestático a 85 °C, um balão de destilação de 50 mL, contendo a amostra (Figura 25), ao qual se adicionaram os reagentes necessários à transesterificação. Assim, adicionou-se 4 mL de solução metanólica NaOH juntamente com reguladores de ebulição, deixando que a mistura entrasse em ebulição até ao desaparecimento de gotas de matéria gorda. Ao fim de 10 min adicionou-se, através do refrigerante, 5 mL da solução de trifluoreto de boro. Após 3 min em ebulição, adicionou-se 3 mL de iso-octano, e retirou-se o balão do calor. Ainda quente misturou-se 20 mL da solução saturada de NaCl e agitou-se fortemente para permitir a devida separação das fases. Finalmente, retirou-se a camada superior e filtrou-se, para remoção de humidade, passando por sulfato de sódio anidro, obtendo-se a amostra pronta a ser analisada por cromatografia gasosa (GC) Este procedimento encontra-se de acordo com a norma europeia EN ISO 5509:2001.

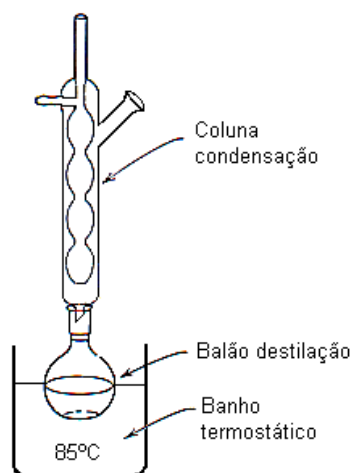


Figura 25 - Esquema de processo para a preparação de ésteres metílicos (89)

#### 3.7.2 Análise cromatográfica

A quantidade de ácidos gordos foi determinada por cromatografia gasosa (GC). As amostras foram analisadas num cromatógrafo (CP-3800 GC Varian, EUA) equipado com uma coluna capilar de 30m (SUPELLOWAX 10, 0,32 mm diâmetro interno e espessura de filme de 0,25 µm). As temperaturas de injetor (split 1:50) e detector (por ionização de chama) foram mantidas constantes a 250 °C. O programa de temperatura do forno iniciou-se a 200 °C durante 20 min, aumentando-se até atingir 220 °C, a uma velocidade de 15°C/min, sendo a temperatura constante durante 20 min. O gás de arrasto que percorre a coluna, He, manteve-se a um caudal de 1,2 mL/min. Foram injectados padrões de ésteres metílicos de ácidos gordos de forma a identificar a presença dos mesmos nas amostras extraídas do Soxhlet. A composição dos ácidos gordos foi calculada pela percentagem da totalidade de

ácidos gordos presentes na amostra, determinada através da área dos picos. O conteúdo de ácidos gordos foi calculado segundo a EN 14103 (2003).

### **3.7.3 Análise da concentração de iões de alumínio**

A presença de alumínio na biomassa após a electrocoagulação foi analisada por Espectrometria de Absorção Atómica de Chama num laboratório certificado (Laboratório de Biocombustíveis e Ambiente LNEG\_UB\_LBA) para avaliar a eventual contaminação da microalga pelos eléctrodos de alumínio.

## 4. Resultados e discussão

Foram realizados diversos estudos conducentes à optimização das condições de remoção da biomassa microalgal do seu meio de cultura, através da electrocoagulação. Além de diferentes intensidades de corrente e tempos de electrólise, usaram-se eléctrodos de diferentes espessuras, variaram-se volumes e também diferentes fases de crescimento da cultura.

### 4.1 Efeito da densidade de corrente

Num primeiro estudo, avaliaram-se três medidas de largura de eléctrodos, e foram aplicadas diferentes intensidades de corrente de forma a avaliar o impacto da electrocoagulação nas partículas e também para verificar a melhor relação intensidade de corrente/área para melhores percentagens de eficiência de remoção e consumo energético envolvidos no sistema.

Usaram-se copos graduados com 500 mL de cultura para cada par de eléctrodos, aplicando correntes de 50 mA, 100 mA, 250 mA e 500 mA (densidades de corrente desde 0,6 mA/cm<sup>2</sup> a 16,7 mA/cm<sup>2</sup>). O tempo decorrido para cada experiência foi de 10 minutos. Para cada caso de espessura dos eléctrodos de alumínio, a área total submersa na solução foi a seguinte (Tabela 8):

Tabela 8 – Área de submersão para cada espessura de eléctrodo

| Espessura do Eléctrodo | Altura submersa [cm] | Área submersa [cm <sup>2</sup> ] |
|------------------------|----------------------|----------------------------------|
| 1 cm                   | 7,5                  | 30                               |
| 2 cm                   |                      | 60                               |
| 3 cm                   |                      | 90                               |

Medindo de minuto em minuto a corrente e a diferença de potencial do sistema, ajustando a tensão de forma a obter corrente constante, calculou-se a potência fornecida fazendo uma análise aproximada da energia consumida ao longo de cada experiência.

Após a aplicação da corrente, deixou-se repousar a cultura durante 30 minutos para permitir que as microbolhas de O<sub>2</sub> e/ou H<sub>2</sub> libertadas pelos eléctrodos interagissem com as partículas da microalga, que por sua vez sofreram uma alteração de polaridade, e tivessem um efeito de agregação umas com as outras, flutuando à superfície (flotação), ou se depositassem no fundo (sedimentação), conseguindo-se assim a separação da biomassa do sobrenadante.

Depois desse repouso, recolheram-se amostras para fazer medição da densidade óptica e pH do meio (abaixo do nível das partículas flutuantes) para o cálculo da percentagem de remoção, comparando com os valores obtidos a partir de uma amostra de controlo (sem efeito de electrocoagulação). Os resultados para cada experiência são apresentados na Tabela 9 e Figura 26:

Tabela 9 – Eficiência de remoção (%) para as diferentes intensidades de corrente e espessura de eléctrodo, após um repouso de 30 min

| Corrente [mA] | Eficiência Remoção % |      |      |
|---------------|----------------------|------|------|
|               | 1 cm                 | 2 cm | 3 cm |
| 50            | 70,9                 | 38,3 | 34,4 |
| 100           | 90,1                 | 81,9 | 60,5 |
| 250           | 96,9                 | 94,3 | 85,4 |
| 500           | 97,5                 | 97,0 | 89,8 |



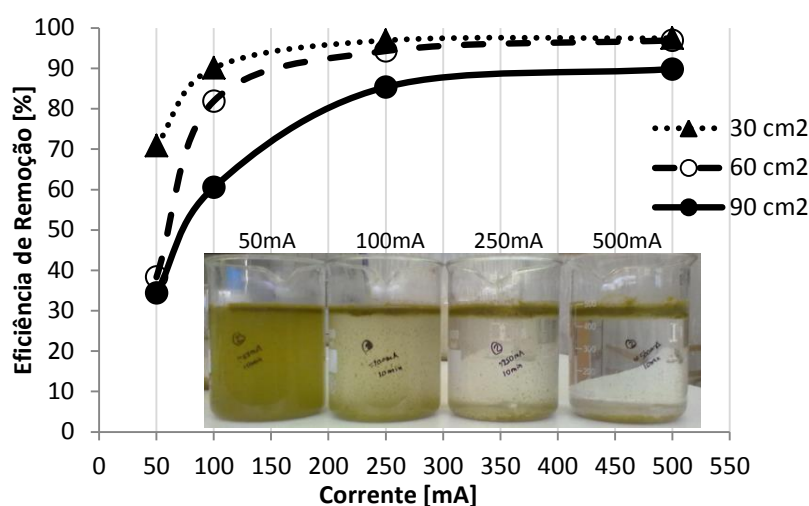


Figura 26 - Eficiência de remoção (%) para diferentes intensidades de corrente e áreas de eléctrodo, após um repouso de 30 min

É de notar que quanto maior a área de eléctrodo, menor a eficiência de remoção, pois para o eléctrodo de menor largura a corrente é mais concentrada na reduzida área que está submersa na amostra.

#### 4.2 Efeito do tempo de repouso

Posteriormente, após 24 horas, recolheram-se novamente amostras do meio, para analisar a influência do tempo de repouso na eficiência de remoção (Figura 27). Pode-se concluir que é possível atingir valores de eficiência de remoção superior a 90%, aplicando densidades de corrente acima de  $3,3 \text{ mA/cm}^2$ , sendo que se atinge o máximo de remoção de 97% com uma densidade de corrente de aproximadamente  $8,3 \text{ mA/cm}^2$ . Densidades de corrente superiores, como  $16,7 \text{ mA/cm}^2$ , não alteram significativamente a eficiência de remoção máxima. Verifica-se também que quanto mais tempo as amostras ficam em repouso, obtém-se maior eficiência de remoção, pois as partículas que sofreram menor efeito da electrólise têm mais tempo para se agregarem a outras em suspensão.

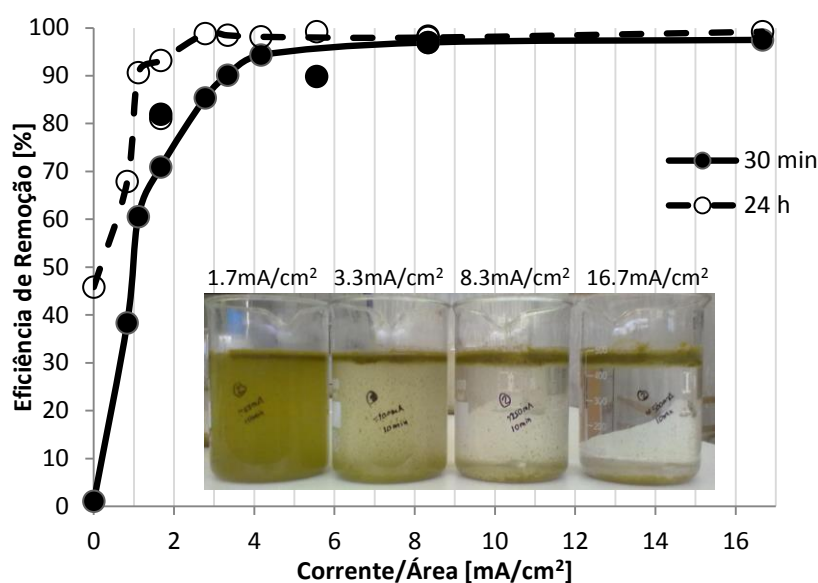


Figura 27 - Eficiência de remoção (%) para diferentes densidades de corrente e para os diferentes tempos de repouso (30 min e 24 h)

#### 4.3 Efeito da área de eléctrodos vs volume de cultura

Numa segunda experiência, estudou-se o efeito da área de eléctrodos na eficiência de remoção e a energia consumida variando o volume de cultura, para avaliar a melhor condição na separação das fases. Predefiniu-se assim uma densidade de corrente de 3,3 mA/cm<sup>2</sup>.

O procedimento e o cálculo da eficiência de remoção foram os mesmos descritos anteriormente, para 30 min de repouso. Obtiveram-se então os seguintes valores de remoção (Tabela 10 e Figura 28).

Tabela 10 – Eficiência de remoção (%) para diferentes razões área de eléctrodo/volume de cultura

| Área/Volume<br>[cm <sup>2</sup> /L] | Eficiência de<br>Remoção [%] |
|-------------------------------------|------------------------------|
| 30                                  | 91.8                         |
| 60                                  | 93.7                         |
| 90                                  | 97.4                         |
| 120                                 | 98.5                         |
| 180                                 | 98.9                         |

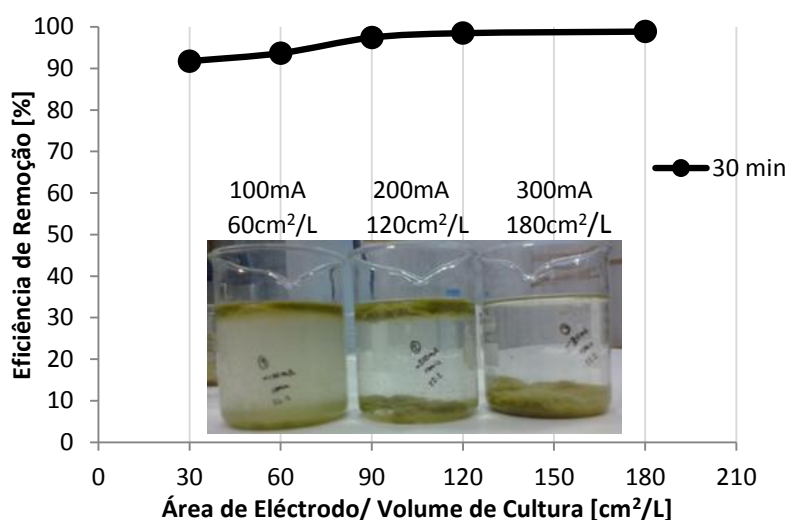


Figura 28 - Eficiência de remoção (%) para diferentes razões área de eléctrodo/volume de cultura

Verificou-se que aplicando a mesma densidade de corrente de  $3,3 \text{ mA/cm}^2$  se atinge valores de remoção bastante elevados, acima de 90%, mesmo para a razão área de eléctrodos/volume de cultura mais baixa. A eficiência melhora com o aumento da razão área de eléctrodo/volume de cultura, atingindo o seu máximo de 98,9% com  $180 \text{ cm}^2/\text{L}$ . Este aumento pode ser explicado pelo aumento de alumínio libertado pelos eléctrodos, que pode perturbar a biomassa suspensa e a formação de flocos.

#### 4.4 Efeito da concentração de biomassa e da fase de crescimento

Avaliou-se o efeito da fase de crescimento da microalga e da sua concentração na eficiência de remoção por electrocoagulação através de um estudo semanal.

Foi possível verificar ao longo das semanas uma alteração de coloração da cultura no bioreactor, indicando o crescimento desta. Inicialmente a cultura apresentava uma coloração verde-clara indicando uma baixa densidade de células no meio (Figura 29).



Figura 29 - Cultura de microalga em diferentes estados de crescimento/concentração de biomassa

À medida que a microalga vai crescendo, mais densa e concentrada fica a cultura. A coloração desta escurece tomando tons de verde acastanhado chegando mesmo a ficar alaranjado, na fase estacionária do seu crescimento, revelando a presença de pigmentos carotenóides. O crescimento da microalga é representável por uma curva exponencial, chegando a um patamar estacionário, em condições ideais, ao fim de cerca de dois/três meses (dependendo da alga). Esta fase estacionária é considerada a altura ideal de extracção dos óleos acumulados intracelularmente.

Este crescimento poderá ser acelerado, se se sujeitar a microalga a condições de *stress* extremo, como por exemplo privação de nutrientes, luz, CO<sub>2</sub> e alterações na temperatura a que está exposta.

Verificou-se na análise semanal realizada, que a densidade óptica aumenta como consequência do crescimento celular, e que o pH sofre variadas oscilações, tendendo com o envelhecimento da cultura, a tornar-se mais alcalino.

Foi avaliada a eficiência de remoção durante 11 semanas de cultivo usando densidades de corrente de 3,3 mA/cm<sup>2</sup> e 8,3 mA/cm<sup>2</sup>, em ensaios de electrocoagulação de 10 min. Estas densidades de corrente foram escolhidas pois ambas apresentaram eficiências de remoção acima de 90%.

No estado inicial de crescimento, o procedimento de electrocoagulação tem elevado rendimento na separação do meio sobrenadante e da biomassa. À medida que a microalga foi crescendo e aumentando a sua concentração de biomassa, é perceptível ligeiras reduções na eficácia da separação (Figura 30).

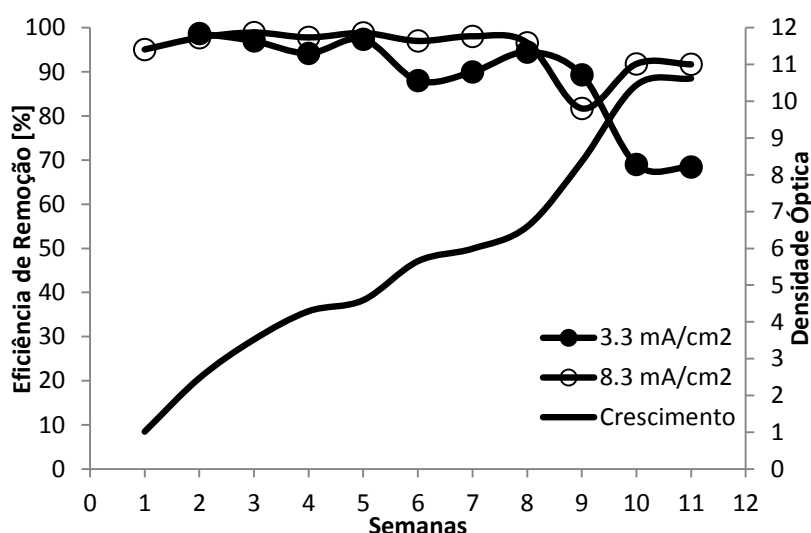


Figura 30 - Análise semanal da eficiência de remoção consoante a fase de crescimento

Para os períodos de crescimento até 8 semanas, verificou-se uma eficiência de remoção que se mantém acima de 90%, decrescendo até 68% ( $\pm 1\%$ ) para a densidade de corrente mais baixa quando a concentração de microalga e conteúdo de óleo da biomassa atinge o seu valor máximo (Tabela 11). Existem na literatura estudos que corroboram estes resultados e descrevem uma diminuição de eficiência de remoção aquando do aumento da concentração de biomassa (74). Para a densidade de corrente de 8,3 mA/cm<sup>2</sup>, os resultados continuaram a ser superiores a 90%, havendo no entanto, uma redução de cerca de 5 a 8%.

Tabela 11 – Eficiência remoção para períodos de crescimento de 4, 8 e 11 semanas

| Densidade<br>Corrente  | Eficiência de Remoção % |           |            |
|------------------------|-------------------------|-----------|------------|
|                        | 4 semanas               | 8 semanas | 11 semanas |
| 3,3 mA/cm <sup>2</sup> | 94,2                    | 94,5      | 68,4       |
| 8,3 mA/cm <sup>2</sup> | 97,8                    | 96,6      | 91,7       |
| Peso seco g/L          | 1,8                     | 2,3       | 3,9        |

#### 4.5 Efeito do tempo de electrocoagulação

Foi realizada uma experiência para avaliar o efeito do tempo de electrólise mantendo uma densidade de corrente de 8,3 mA/cm<sup>2</sup>, pela elevada eficiência de remoção conseguida nas experiências anteriores (cerca de 97%).

Verificou-se que a eficiência de remoção da electrocoagulação segue uma curva sigmoidal que aumenta com a duração da electrólise (Figura 21). Demonstrou-se que 10 min são suficientes para atingir uma eficiência de remoção de 96% após 30 min de repouso. Estes resultados são concordantes com estudos realizados para remoção de *Phaeodactylum tricornutum*, igualmente uma microalga marinha, com 10 min de electrólise, em que se conseguiu uma remoção de 80% (68).

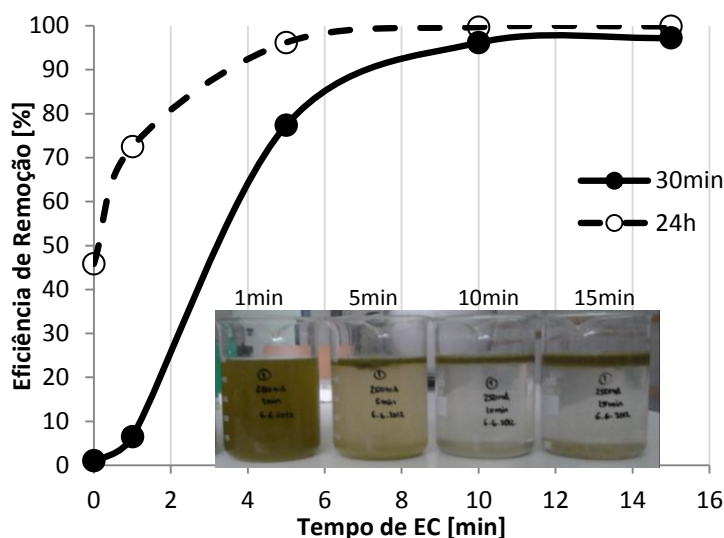


Figura 31 - Efeito do tempo de electrocoagulação na eficiência de remoção

Apesar da baixa eficiência de remoção para 5 min de electrocoagulação e após 30 min de repouso (Tabela 12) é possível atingir eficiência de 96% se se deixar a cultura repousar por 24 h (Figura 21).

Tabela 12 – Eficiência de remoção (%) para diferentes tempos de electrocoagulação

| Tempo | Eficiência de Remoção % |      |      |      |      |
|-------|-------------------------|------|------|------|------|
|       | 0                       | 1    | 5    | 10   | 15   |
| 30min | 1,04                    | 6,5  | 77,4 | 96,1 | 97,2 |
| 24h   | 45,8                    | 72,5 | 96,2 | 99,7 | 99,9 |

#### 4.6 Qualidade da biomassa após electrocoagulação

Pelas experiências realizadas foi possível concluir que a electrocoagulação tem uma eficiência de remoção interessante e é favorável como método de colheita da microalga *Nannochloropsis* sp.. No

entanto era fundamental avaliar a qualidade da biomassa recolhida por este método, nomeadamente em termos de óleos e pigmentos, para avaliar a sua aplicabilidade.

#### 4.6.1 Conteúdo de óleo e perfil de ácidos gordos

Foi determinado o conteúdo de óleo, nas amostras de biomassa submetidas às densidades de corrente de 3,3 mA/cm<sup>2</sup> e 8,2 mA/cm<sup>2</sup>, comparando com o óleo presente na amostra de controlo não sujeita à electrocoagulação. Os resultados obtidos revelam que as amostras que passaram pelo processo de electrólise não apresentam alterações significativas quanto à sua composição relativamente às amostras de controlo, sendo que o conteúdo total de óleo presente ronda os 40% ( $\pm 5\%$ ) nas amostras estudadas. Este valor está de acordo com outros estudos realizados com a mesma microalga (90).

O óleo extraído foi caracterizado em termos de perfil de ácidos gordos (tabela 13).

Tabela 13 – Perfil de ácidos gordos da biomassa controlo (sem electrocoagulação) e da biomassa recolhida por diferentes densidades de corrente de EC

| Ácidos Gordos | Controlo [%]                       | EC 3,3mA/cm <sup>2</sup> [%]       | EC 8,3mA/cm <sup>2</sup> [%]       |
|---------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| C14:0         | 2,92 $\pm$ 0,11                    | 2,91 $\pm$ 0,04                    | 2,87 $\pm$ 0,04                    |
| C15:0         | 0,37 $\pm$ 0,01                    | 0,37 $\pm$ 0,00                    | 0,37 $\pm$ 0,00                    |
| <b>C16:0</b>  | <b>33,44 <math>\pm</math> 0,27</b> | <b>33,50 <math>\pm</math> 0,12</b> | <b>33,36 <math>\pm</math> 0,19</b> |
| <b>C16:1</b>  | <b>34,18 <math>\pm</math> 0,16</b> | <b>34,36 <math>\pm</math> 0,20</b> | <b>34,34 <math>\pm</math> 0,04</b> |
| C17:0         | 0,41 $\pm$ 0,01                    | 0,38 $\pm$ 0,00                    | 0,38 $\pm$ 0,01                    |
| C18:0         | 1,04 $\pm$ 0,05                    | 1,01 $\pm$ 0,01                    | 1,02 $\pm$ 0,00                    |
| <b>C18:1</b>  | <b>21,13 <math>\pm</math> 0,45</b> | <b>21,27 <math>\pm</math> 0,03</b> | <b>21,19 <math>\pm</math> 0,13</b> |
| C18:2         | 0,74 $\pm$ 0,12                    | 0,69 $\pm$ 0,01                    | 0,68 $\pm$ 0,00                    |
| C18:3         | 0,31 $\pm$ 0,40                    | 0,31 $\pm$ 0,00                    | 0,31 $\pm$ 0,02                    |
| <b>C20:4</b>  | <b>1,19 <math>\pm</math> 0,24</b>  | <b>1,35 <math>\pm</math> 0,01</b>  | <b>1,33 <math>\pm</math> 0,02</b>  |
| <b>C20:5</b>  | <b>1,67 <math>\pm</math> 0,43</b>  | <b>1,96 <math>\pm</math> 0,01</b>  | <b>1,89 <math>\pm</math> 0,03</b>  |
| Saturados     | 38,17 $\pm$ 0,42                   | 38,16 $\pm$ 0,08                   | 37,99 $\pm$ 0,24                   |
| Insaturados   | 59,23 $\pm$ 0,68                   | 59,93 $\pm$ 0,22                   | 59,75 $\pm$ 0,11                   |
| Total         | 97,40 $\pm$ 0,26                   | 98,09 $\pm$ 0,14                   | 97,73 $\pm$ 0,13                   |

Os principais ácidos gordos presentes nas biomassas analisadas foram C16:0, C16:1 e C18:1 com valores de 33%, 34% e 21%, respectivamente, e em menores concentrações foi possível detectar C20:4 e C20:5, cerca de 1,3% e 1,7% de média, respectivamente. Esta composição de óleo obtida após a electrocoagulação está em acordo com os valores apresentados em estudos anteriores (30) (90).

No entanto, o teor de ácidos gordos polinsaturados ( $\geq 4$  duplas ligações) é superior ao especificado na norma europeia de qualidade para biodiesel (EN 14214:2012), o que implicaria a sua remoção/diminuição de modo a cumprir o valor exigido relativamente a este parâmetro ( $< 1\%$ ).

#### 4.6.2 Conteúdo e perfil de pigmentos

O conteúdo e perfil dos pigmentos foram analisados após a electrocoagulação para a densidade de 3,3 mA/cm<sup>2</sup> e 8,3 mA/cm<sup>2</sup> e comparados com os resultados da amostra de controlo. Os valores obtidos demonstram uma redução, de cerca de 1% ( $\pm 0,5\%$ ), da quantidade total de pigmentos na amostra sem

electrólise em relação à quantidade presente na biomassa após a electrólise. Esta diminuição torna-se mais evidente na densidade de corrente de  $8,3 \text{ mA/cm}^2$ . No entanto, os perfis de pigmentos para ambas as amostras, são semelhantes ao da amostra de controlo. A Figura 32 demonstra claramente o perfil para cada caso, e as diferenças entre eles.

O decréscimo observado na composição de biomassa após o processo de electrocoagulação, pode ser explicado devido a uma ligeira oxidação dos pigmentos, que consequentemente, se converteram para os seus ésteres correspondentes. Uma forma de evitar este decréscimo será realizar rapidamente a electrocoagulação e devida extracção de pigmentos, para prevenir a oxidação pelo processo da electrólise e efeitos de outros agentes oxidantes como oxigénio, pH, luz e temperatura.

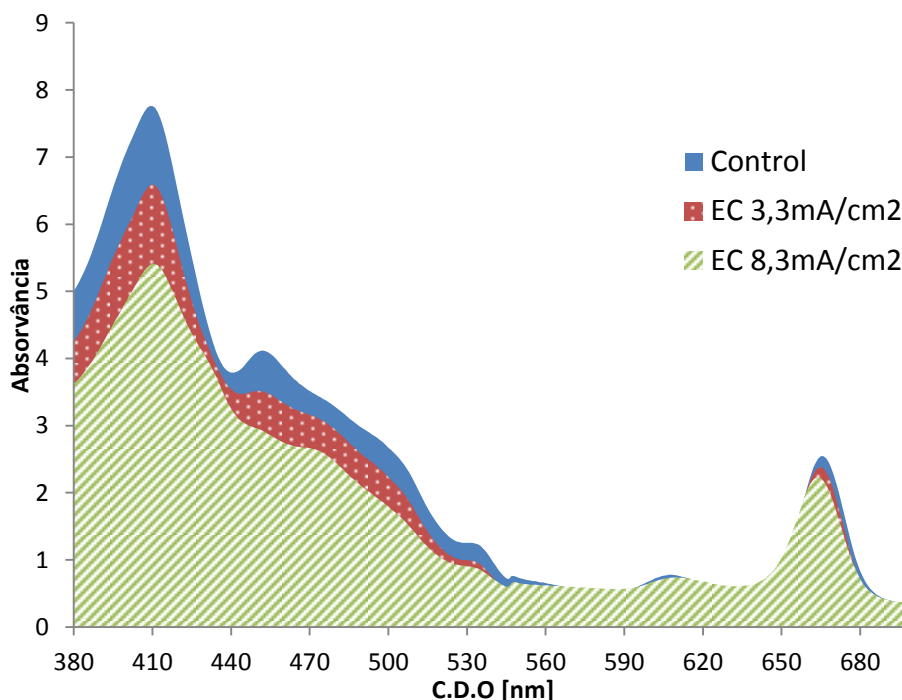


Figura 32 - Espectro de absorção de pigmentos antes e depois da electrocoagulação

No entanto, o decréscimo de astaxantina e cantaxantina (Figura 33) é aparente, pois corresponde ao processo de carotenogénese, visto que estes carotenóides foram convertidos nos seus ésteres correspondentes, sendo que estes continuam a ser produtos de valor acrescentado.

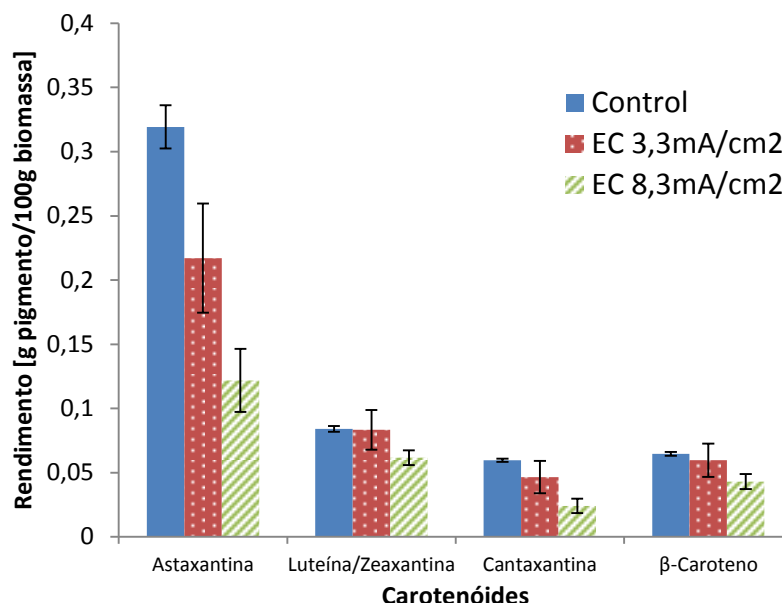


Figura 33 - Perfil de pigmentos antes e depois da electrocoagulação

#### 4.6.3 Conteúdo de Alumínio

Foi analisada a acumulação de alumínio na biomassa recolhida para as densidades de corrente de 3,3 mA/cm<sup>2</sup> e 8,3 mA/cm<sup>2</sup>, obtendo-se valores de 0,56% e 1,39%, respectivamente. Estes resultados, estão de acordo com estudos realizados por outros autores, que apontam que a libertação de metal dos eléctrodos é directamente proporcional à densidade de corrente e ao tempo de electrólise (68).

Os resultados obtidos no presente trabalho são, no entanto, ligeiramente inferiores aos reportados nesses estudos que indicam 1,5% de alumínio na biomassa para uma electrocoagulação com densidade de corrente de 3 mA/cm<sup>2</sup> durante 10 min (68).

Após avaliação da qualidade da biomassa de *Nannochloropsis* sp. recolhida após a electrólise pode-se concluir que ela mantém uma boa qualidade para a produção de biodiesel e/ou aditivos de pigmentação de alimentos.

Alguns estudos indicam que comparando a electrocoagulação com a coagulação convencional, usando as microalga *Scenedesmus acutus* e *Chlorella vulgaris*, a electrólise é mais eficiente que a floculação, devido ao seu baixo custo, menor tempo e menor contaminação da biomassa recolhida (67). Os mesmos autores, usando outras culturas de microalgas, também concluíram que o efluente gerado pela electrocoagulação não continha químicos e possuía uma melhor qualidade que o efluente obtido da coagulação convencional.

#### 4.7 Energia consumida pela remoção da biomassa

Foi efectuada uma avaliação da energia consumida nas diferentes experiências de electrocoagulação e comparou-se com outros métodos de remoção, nomeadamente com a centrifugação e a floculação convencional.



Da análise da energia consumida para cada experiência realizada, é evidente que, para uma eficiência de remoção mais elevada, se requer um aumento de potência no processo de electrólise. Na Figura 34 é possível ver o aumento de eficiência consoante o aumento da procura de energia.

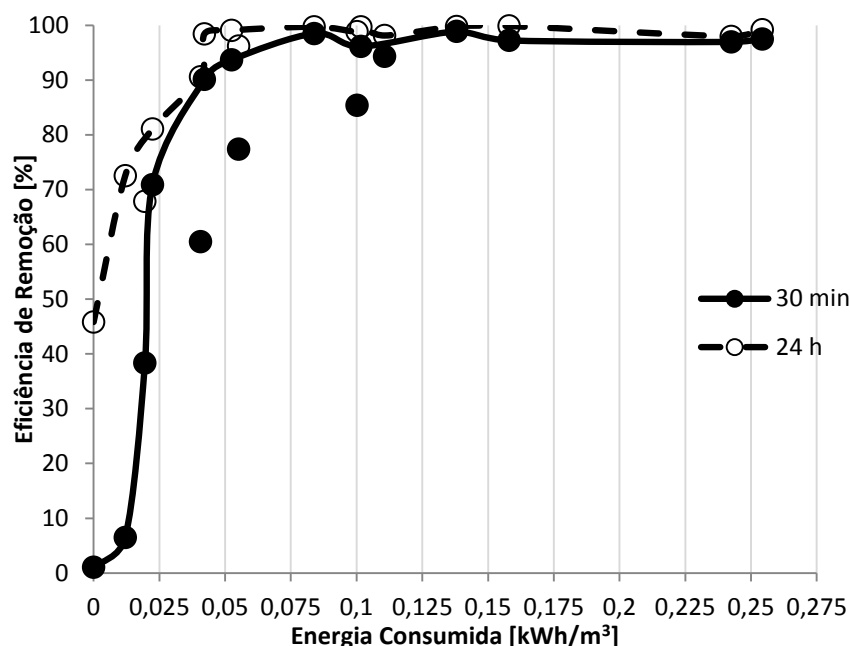


Figura 34 - Eficiência de remoção vs energia consumida em cada experiência

Para atingir níveis de remoção acima dos 90% a energia requerida pelo processo de electrocoagulação deve ser acima de 0,05 kWh/m³, e para atingir níveis de 98% a energia será superior a 0,075 kWh/m³, com um intervalo de repouso de 30 min.

Outros estudos realizados em experiências de electrocoagulação com microalgas não marinhas, apresentaram valores de consumo energético de 0,3 kWh/m³, com eficiências de remoção de 95% (69). Pelos resultados obtidos no presente estudo e em concordância com experiências de outros autores, é possível assumir que a energia despendida na remoção de microalgas marinhas é de uma ordem de grandeza inferior à das microalgas não marinhas (68).

Tal como foi referido anteriormente, o processo de colheita é uma etapa de grande consumo energético para a produção de biodiesel. Por norma este processo é realizado através da centrifugação que pode consumir de 1 a 8 kWh/m³. (55) (91) (92)

Neste trabalho foram estudados três cenários do consumo energético, para cada processo de colheita de biomassa, para a produção de 1000 MJ<sub>biodiesel</sub>.

No primeiro cenário foi considerada a utilização somente da centrifugação durante a colheita, obtendo cerca de 0,05% a 16% de biomassa seca. Num segundo e terceiro cenário foi considerada a combinação da electrocoagulação e centrifugação para duas condições diferentes de consumo energético, respectivamente 0,3 kWh/m³, de acordo com estudos apresentados por outros autores (69) e 0,06 kWh/m³, do presente estudo. Ainda um quarto cenário foi analisado em que se aplica o método convencional de floculação anterior à centrifugação, de acordo com resultados de outros estudos (93). Os dados utilizados para efectuar estes cálculos são apresentados na tabela 14.

Tabela 14 – Dados para avaliação energética de diferentes cenários de colheita

|   |      |                                      |
|---|------|--------------------------------------|
| Unidade de Combustível (91)                       | 1000 | MJ <sub>biodiesel</sub>              |
| PCI de Biodiesel (5)                              | 37   | MJ/kg <sub>biodiesel</sub>           |
| Concentração inicial de microalga                 | 2    | g/L                                  |
| Peso seco após EC (neste estudo)                  | 6,3  | %                                    |
| Peso seco após Floculação (suposição)             | 6,3  | %                                    |
| Peso seco após Centrifugação (93)                 | 16   | %                                    |
| Conteúdo de óleo da microalga (90)                | 40   | %                                    |
| Rendimento de processo de extracção de óleo (91)  | 92,5 | %                                    |
| Rendimento de processo de transesterificação (91) | 96,4 | %                                    |
| Humidade após secagem (91)                        | 9    | %                                    |
| Potência da centrifuga (91)                       | 45   | kW                                   |
| Capacidade da centrifuga (91)                     | 45   | m <sup>3</sup> /h                    |
| Consumo energético de EC 1 (69)                   | 0,3  | kWh/m <sup>3</sup>                   |
| Consumo energético de EC 2 (neste estudo)         | 0,06 | kWh/m <sup>3</sup>                   |
| Consumo energético da Floculação (93)             | 71   | MJ/ton <sub>Chlorella vulgaris</sub> |

Na figura 35 encontram-se os dados obtidos para a estimativa da energia associada a cada um dos cenários descritos acima. É evidente que a combinação dos dois processos de electrocoagulação e centrifugação (EC + Centrif) e/ou floculação e centrifugação (Floc + Centrif) tem mais vantagens que recorrer somente à centrifugação da biomassa, pois a energia total despendida no processo de colheita pode reduzir-se de 135 MJ/1000 MJ<sub>biodiesel</sub> na centrifugação para cerca de 11 MJ/1000 MJ<sub>biodiesel</sub> com electrocoagulação + centrifugação ou 8 MJ/1000 MJ<sub>biodiesel</sub> com a floculação + centrifugação. No entanto, no procedimento de floculação, é adicionada uma elevada quantidade de químicos (floculantes) que contaminam significativamente a biomassa, o que inviabiliza o uso dessa biomassa na produção de produtos alimentícios bem como produtos farmacêuticos. Além dessa contrariedade, o uso de floculantes torna o custo de colheita e produção de biomassa muito elevado.

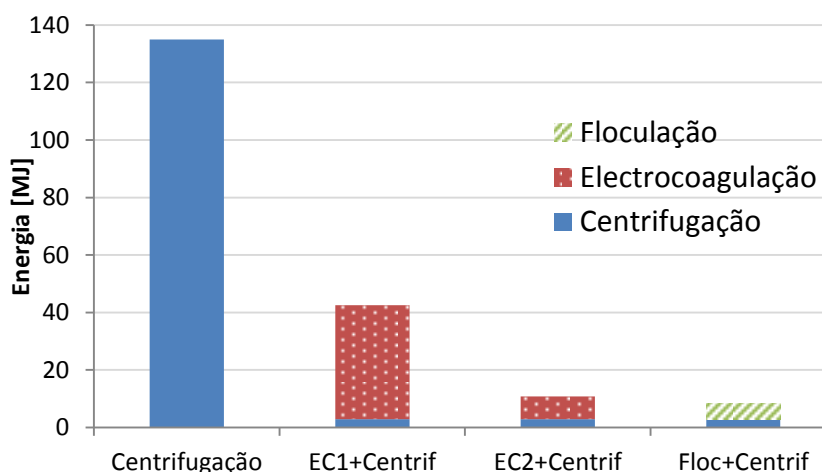


Figura 35 - Estimativas de avaliação energética de diferentes cenários de colheita para produção de biodiesel (1000 MJ<sub>biodiesel</sub>)

Após a etapa da colheita de biomassa, é necessário fazer a remoção de água desta recorrendo a um processo de secagem. Este processo tem um consumo de cerca de 3556 kJ/kg de água removida que corresponde a cerca de 1380 MJ/1000 MJ<sub>biodiesel</sub> para atingir um conteúdo de humidade de 9% (91). A energia consumida por este processo está dependente da eficiência da centrifugação, e por isso assume-se que a combinação dos métodos de electrocoagulação ou floculação com a centrifugação aumenta a eficiência de remoção de água ao passar para a etapa de secagem, reduzindo assim a energia consumida no fim de todo o processo. Actualmente investigadores avaliam possibilidades para extracção de lípidos a partir de biomassa húmida de forma a evitar o gasto energético no processo de secagem.

## 5. Conclusões

A colheita de microalgas de forma económica e energeticamente eficiente é um importante passo que tem de ser melhorado e optimizado, com vista à aplicação das microalgas como matéria-prima para produção de biocombustíveis em larga escala. Os principais obstáculos são a baixa concentração de biomassa, o reduzido tamanho das células e a estabilidade em grandes volumes de cultura.

A *Nannochloropsis* sp. é uma microalga marinha e apresentou resultados de eficiência de remoção superiores aos observados com outras microalgas que crescem em meios não salinos, pelo que é uma boa aposta utilizar esta espécie neste tipo de procedimento, especialmente pelo seu alto teor em óleos. A melhor eficiência de remoção por electrocoagulação foi igual ou superior a 97%, obtida usando uma densidade de corrente de 8,3 mA/cm<sup>2</sup> durante 10 minutos de operação e com um consumo de energia inferior a 0,25 kWh/m<sup>3</sup>. Verificou-se por cromatografia gasosa (GC) e líquida (HPLC) que o perfil tanto de ácidos como de pigmentos da biomassa microalgal não sofreram alterações significativas por efeito da electrocoagulação. Sendo assim, parece ser possível utilizar a electrocoagulação como método de colheita da biomassa microalgal para a sua utilização na produção de biodiesel e/ou como aditivos para alimentos animais e humanos, produtos farmacêuticos e/ou cosméticos.

É importante salientar que o processo tradicional de centrifugação para colheita da biomassa pode ser substituído/complementado por outros processos, nomeadamente a electrocoagulação, reduzindo assim drasticamente a energia necessária para recolha da biomassa (de 135 MJ/MJ<sub>biodiesel</sub> para 11 MJ/MJ<sub>biodiesel</sub>). No entanto, as condições operacionais, tais como densidades de corrente, tempo, área do eléctrodo, estado fisiológico e idade da cultura devem ser optimizadas de modo a obter uma boa eficiência de remoção.

## **6. Trabalhos futuros**

O processo de electrocoagulação deverá ser mais investigado para diferentes tipos de microalgas, tanto de água doce como salgada, e as condições operacionais optimizadas (densidades de corrente, tempo, área do eléctrodo, estado fisiológico e idade da cultura) para cada caso.

Deverá analisar-se o sobrenadante após o processo de colheita da biomassa, com vista à reciclagem deste para obtenção de novo meio para uma cultura posterior, reduzindo assim o desperdício de água.

Para evitar o consumo energético associado ao processo de secagem da biomassa microalgal, pode-se estudar o rendimento do processo de extracção de óleos em biomassa húmida após a electrocoagulação. Também se pode avaliar a influência da biomassa lavada previamente com água destilada de forma a retirar parte dos sais presentes, que possam interferir com o solvente utilizado na extracção dos óleos bem como na extracção dos pigmentos.

## 7. Referências

1. [www.eea.europa.eu/pt/pressroom/newsreleases/poluicao-proveniente-do-trafego-continua](http://www.eea.europa.eu/pt/pressroom/newsreleases/poluicao-proveniente-do-trafego-continua). visitado em Novembro 2012.
2. **Antunes, R., Silva, I. C.** *Utilização de algas para a produção de biocombustíveis*. 2010.
3. **Eurostat Pocketbooks.** *Energy, transport and environmental indicators*. 2003-2012.
4. **Parlamento Europeu e do Conselho de 8 de Maio de 2003.** *Directiva 2003/20/CE - Promoção da utilização de biocombustíveis ou de outros combustíveis renováveis nos transportes*. 17/05/2003.
5. **Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Abril de 2009.** *Directiva 2009/28/CE - Promoção da utilização de energia proveniente de fontes renováveis*. 05/06/2009.
6. **EurObserv'ER.** *Biofuels barometer*. 2006-2012.
7. **Ministério da Economia e da Inovação - Diário da República.** *Decreto Lei nº 62/2006*. 21/03/2006.
8. —. *Decreto Lei nº 206/2008*. 23/10/2008.
9. —. *Decreto Lei nº 49/2009*. 26/02/2009.
10. **Ministério da Enconomia e da Inovação - Diário da República.** *Decreto Lei nº 117/2010*. 25/10/2010.
11. **Direcção Geral de Geologia e Energia.** *Relatório nacional relativo à promoção da utilização de biocombustíveis ou de outros combustíveis renováveis nos transportes em Portugal*. 2004-2010.
12. **Mittelbach, M. e Remschmidt, C.** *Biodiesel: The Comprehensive Handbook*. University of Graz : Institute for Chemistry, 2004.
13. **Lobo, I.P., Ferreira, S.L.C. e Cruz, R.S.** *Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos*. s.l. : Quím. Nova [online], vol.32, n.6 [cited 2013-04-04], pp. 1596-1608, 2009.
14. **Knothe, G., van Gerpen, J. e Krahl, J.** *The Biodiesel Handbook*. Champaign, Illinois : AOCS Press, 2005.
15. **Moser, B.R.** *Biodiesel production, properties, and feedstocks*. s.l. : In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant, 45:229-266, 2009.
16. **Dias, J.M.** *Apontamentos relativos à disciplina de Tecnologias de Tratamento de Resíduos Sólidos*. FEUP : Mestrado Integrado em Engenharia do Ambiente, 2009.
17. **Boyd, M., Murray-Hill, A. e Schaddelee, K.** *Biodiesel in British Columbia - Feasibility Study Report*. s.l. : WISE Energy CO-operative, Eco-Literacy Canada, 2004.

18. **Dias, J. M.** *Biodiesel Production from Wastes: Process Development and Quality Control*. FEUP : Tese de Doutoramento, 2010.
19. **Pérez, Homero E. Bañados.** *Biodiesel de Microalgas*. 2007.
20. **Chiu, S.Y., et al., et al.** *Reduction of CO<sub>2</sub> by a high density culture of Chlorella sp. in a semicontinuous photobioreactor*. s.l. : Bioesource Technology, 99 3389-3396, 2008.
21. [http://db.desertbiofuels.org/wiki/Green\\_Algae\\_Strategy\\_-\\_Chapter\\_1\\_-\\_What\\_is\\_Green\\_Algae\\_Strategy%3F](http://db.desertbiofuels.org/wiki/Green_Algae_Strategy_-_Chapter_1_-_What_is_Green_Algae_Strategy%3F). visitado em Novembro 2012.
22. **Chinnasamy, S., et al., et al.** *Biomass Production Potential of a Wastewater Alga Chlorella vulgaris ARC 1 under Elevated Levels of CO<sub>2</sub> and Temperature*. s.l. : International Journal of Molecular Sciences vol.10, 518-532, 2009.
23. **Ribeiro, R.F.L., et al., et al.** *Evaluation of the potential of microalgae Microcystis novacekii in the removal of Pb<sup>2+</sup> from an aqueous medium*. s.l. : Journal of Hazardous Materials, vol.79, Is.1-3,15,947-953, 2010.
24. **Lemarie, G., et al., et al.** *Nitrogenous and phosphorous waste production in a flow-through land-based farm of European seabass (Dicentrarchus labrax)*. s.l. : Aquatic Living Resources, vol.11 (4):247-254, 1999.
25. **Medeiros, M.B. e Lopes, J.S.** *Biofertilizante líquidos e sustentabilidade agrícola na Bahia*. s.l. : Agrícola, vol.7, n.3, 2006.
26. **Spolaore, P., et al., et al.** *Commercial Applications of Microalgae*. s.l. : Journal of Bioscience And Bioengineering, 101:87-96, 2006.
27. **Ueno, Y., Kurano, N. e Miyachi, S.** *Ethanol production by dark fermentation in the marine green alga, Chlorococcum littorale*. s.l. : J Ferment Bioeng, 86(1):38-43, 1998.
28. **Amin, S.** *Review on biofuel oil and gas production process from microalgae*. s.l. : Energy Conversion and Management, 50, 1834-1840, 2009.
29. **Antunes, R. e Silva, I.C.** *Utilização de algas para a produção de biocombustíveis*. Dezembro 2010.
30. **Gouveia, L. e Oliveira, A.C.** *Microalgae as a raw material for biofuels production*. s.l. : Journal Industrial Microbiology Biotechnology, 36, 269-274, 2008.
31. **Chisti, Y.** *Biodiesel from microalgae*. s.l. : Elsevier, Biotechnology Advances 25, 294-306, 2007.
32. <https://www.google.pt/search?q=microalgae&client=firefox-a&hs=rD2&rls=org.mozilla:pt-PT:official&channel=fflb&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ei=unIPUpqqLIOv7Aae24HgBg&ved=0>

CAkQ\_AUoAQ&biw=1280&bih=681#bav=on.2,or.r\_qf.&channel=fflb&fp=52f45ea914794ae2&q=microal. visitado em Abril 2013.

33. **Molina-Grima, E.** *Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics.* s.l. : Biotechnology Advances, vol.20, p.491-515, 2003.

34. [http://algae-energy.co.uk/biofuel\\_production/cultivation/](http://algae-energy.co.uk/biofuel_production/cultivation/). visitado em Novembro 2012.

35. <http://www.popularmechanics.com/science/energy/biofuel/4213775>. visitado em Novembro 2012.

36. **Volkmann, H., et al., et al.** *Cultivation of Arthrospira (Spirulina) Platensis in Desalinator Wastewater and Salinated Synthetic Medium: Protein Content and Aminoacid Profile.* s.l. : Brazilian Journal of Microbiology, vol.39:98-101, 2008.

37. **Wellinger, A.** *Algal Biomass Does it save the world? Short reflections.* s.l. : IEA Bioenergy: An international collaboration in Bioenergy, 2009.

38. **Brennan, L. e Owende, P.** *Biofuels from microalge - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products.* s.l. : Renewable and Sustainable Energy Reviews 805, 01-20, 2009.

39. **Melo, M.A.V.** *Perspectivas sobre o uso de microalgas como fonte de energia renovável e mitigação do dióxido de carbono.* São Paulo : s.n., 2010.

40. **Tredici, M.R.** *Mass production of microalgae: photobioreactors.* s.l. : Oxford: Blackwell Science, p.178 – 214, 2004.

41. **Bitoga, J.P., et al., et al.** *Application of computational fluid dynamics for modeling and designing photobioreactors for microalgae production: A review.* s.l. : Elsevier, Computers and Electronics in Agriculture, vol.76, Is 2, 131–147, 2011.

42. <http://catracalivre.com.br/geral/sustentavel/indicacao/predio-que-usa-algas-marinhas-como-fonte-de-energia-e-projetado-na-alemanha/>. visitado em Novembro 2012.

43. <http://www.jouleunlimited.com/why-solar-fuel/overview>. visitado em Novembro 2012.

44. **Colla, L., Ruiz, W.A. e Costa, J.A.V.** *Metabolismo de carbono e nitrogénio em microalgas.* s.l. : Vektor, 12, p.61 – 78, 2002.

45. **Wang, B., et al., et al.** *CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae.* s.l. : Applied Microbiology Biotechnology, 10, 0253-008, 2008.

46. **Raven, P.R., Evert, R.F. e Eichhorn, S.E.** *Biologia vegetal, 5. Ed.* Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1996.



47. **Faintuch, B.L.** *Análise comparativa da produção de biomassa a partir de três cianobactérias empregando distintas fontes nitrogenadas.* São Paulo : s.n., 1989.
48. **Richmond, A.** *Handbook of microalgal mass culture.* s.l. : Boston: CRC Press, 1990.
49. **Grima, E.M., et al., et al.** *Photobioreactors: light regime, mass transfer and scale up.* s.l. : Journal of Biotechnology, 70, p. 231-247, 1999.
50. **Piorreck, M., Baasch, K.H. e Pohl, P.** *Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of fresh water green and blue-green algae under diferente nitrogen regimes.* s.l. : Phytochemistry, 23:207-216, 1984.
51. **Illman, A.M., Scragg, A.H. e Shales, S.W.** *Increase in Chlorella strains calorific values when grow in low nitrogen medium.* s.l. : Enzyme and Microbial Technology, vol.27, p.631-635, 2000.
52. **Xu, H., Miao, X. e Wu, Q.** *High quality biodiesel production from a microalga Chlorella protothecoides by heterotrophic growth in fermenters.* s.l. : Journal of Biotechnology, 126(4):499-507, 2006.
53. **Hossain, ABMS e Salleh, A.** *Biodiesel fuel production from algae as renewable energy.* s.l. : American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 4(3):250-254, 2008.
54. **Pienkos, P.T. e Darzins, A.** *The promise and challenges of microalgal-derived biofuels.* s.l. : Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 3: 431–440, 2009.
55. **Molina-Grima, E.M.** *Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics.* s.l. : Biotechnology Advance, vol.20, Issues 7-8, 2003.
56. **Uduman, N., et al., et al.** *Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels.* s.l. : Journal Renewable Sustainable Energy, 2:012701, 2010.
57. **Pienkos, T.P. e Darzins, A.** *The promise and challenges of microalgal-derived biofuels.* s.l. : Biofuels, bioproducts and biorefining, 3:431-440, 2009.
58. **Shelef, G. e Soeder, C.J.** *Algae biomass.* s.l. : Elsevier, North-Holland, 852 pp., 1980.
59. [www.simplecentrifuge.com](http://www.simplecentrifuge.com). visitado em Novembro 2012.
60. **Salim, S.** *Bio-fuels from ,Micro-algae, Harvesting of Algae for Oil Extraction.* s.l. : Wagenigen University Website, 2010.
61. **Salim, S., Bosma, R. e Vermuë, M.H.** *Harvesting of microalgae by bio-flocculation.* s.l. : Journal Applied Phycol, 23:849-855, 2011.

62. **Belkacem, M., Khodir, M. e Abdelkrim, S.** *Using electrocoagulation–electroflotation technology to treat synthetic solution and textile wastewater, two case studies.* s.l. : Elsevier, Desalination, vol.250, Is.2, p.573–577, 2010.
63. **Sandbank, E. e Shelef, G.** *Harvesting of algae from high-rate ponds by flocculation-flotation.* In: D.D. Mara and M.H. Marecos do Monte (Eds). *Waste Stabilization Ponds.* s.l. : Pergamon Press, Oxford, pp. 257-264, 1988.
64. **Moraine, R., et al., et al.** *Recovery of sewage-born algae: flocculation, flotation and centrifugation techniques.* In: G. Shelef and C.J. Soeder (Eds.), *Algae Biomass.* s.l. : Elsevier, North-Holland, 852 pp., 1980.
65. **Mollah, M.Y., et al., et al.** *Fundamentals, present and future perspectives of electrocoagulation.* s.l. : Journal Hazard Mater 114(1-3):199-210, 2004.
66. **Mouedhen, G., et al., et al.** *Behavior of aluminum electrodes in electrocoagulation process.* s.l. : Journal Hazard Mater, 150(1):124-135, 2008.
67. **Aragon, A.B., Padilla, R.B. e Ursinos, J.A.F.R.** *Experimental study of the recovery of algae cultured in effluents from the anaerobic biological treatment of urban wastewaters.* s.l. : Resources conservation and recycling, 6:293-302, 1992.
68. **Vandamme, D., et al., et al.** *Evaluation of Electro-coagulation-flocculation for harvesting marine and freshwater microalgae.* s.l. : Biotechnology and Bioengineering, vol.108, No.10, 2320-2329, 2011.
69. **Poelman, E., Pauw, N. e Jeurissen, B.** *Potential of electrolytic flocculation for recovery of microalgae.* s.l. : Elsevier, Resources conservation and recycling, 19:1-10, 1997.
70. **Duan, J. e Gregory, J.** *Coagulation by hydrolysing metal salts.* s.l. : Advanced Colloid Interface Science, 100-102:475-502, 2003.
71. **Mameri, N., et al., et al.** *Defluoridation of septentrional Sahara water of north Africa by electrocoagulation process using bipolar aluminium electrodes.* s.l. : Water Resources 32(5):1604-1612, 1998.
72. **Wijesekara, R.G.S., Nomura, N. e Matsumura, M.** *Electrochemical removal of ammonia, chemical oxygen demand and energy consumption from aquaculture waters containing different marine algal species.* s.l. : Journal Chemistry Technology Biotechnology, 80:1408-1415, 2005.
73. **Kim, T.H., et al., et al.** *Decolorization of disperse and reactive dyes by continuous electrocoagulation process.* s.l. : Desalination, 150:165-175, 2002.

74. **Gao, S., et al., et al.** *Electro-coagulation-flotation process for algae removal*. s.l. : Journal Hazard Mater, 177(1-3):336-343, 2010b.
75. **Becker, W.** *Microalgae in human and animal nutrition, biotechnology and applied phycology*. s.l. : London: Blackwell Science, p.312-351, 2004.
76. **Medina, A.R. et al.** *Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids*. s.l. : Biotechnology Advances, vol.16, n.13, p.517-580, 1998.
77. **Derner, R.B., et al., et al.** *Microalgas, produtos e aplicações*. s.l. : Ciência Rural, v.36 n.6 Santa Maria, 2006.
78. **Youdim, K.A., Martin, A. e Joseph, J.A.** *Essential fatty acids and the brain: possible health implications*. s.l. : Int J Dev Neurosci. 18(4/5):383-99, 2000.
79. **Yehuda, S., et al., et al.** *The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane*. s.l. : Neurobiol Aging, 23(5):843-53, 2002.
80. **Gill, I. e Valivety, R.** *Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications*. s.l. : Trends in Biotechnology, n.15, p.401-409, 1997.
81. **Baker, R. e Gunter, C.** *The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption*. s.l. : Trends in Food Science & Technology, n.15, p.484-488, 2004.
82. **Pulz, O. e Gross, W.** *Valuable products from biotechnology of microalgae*. s.l. : Applied Microbiology Biotechnology, v.65, p.635-648, 2004.
83. **Orosa, M.** *Production and analysis of secondary carotenoids in green algae*. s.l. : Journal of Applied Phycology, n.12, p.553-556, 1997.
84. **Skulberg, O.M.** *Bioactive chemicals in microalgae*. s.l. : Blackwell Science, p.485-512, 2004.
85. **Abalde, J.** *Microalgas: cultivo e aplicaciones*. España : Universidade da Coruña, 210p. (Monografías n.26), 1995.
86. **Edge, R. et al.** *The carotenoids as antioxidants: a review*. s.l. : Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, n.41, p.189-200, 1997.
87. **Ben-Amotz, A.** *Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products major industrial species: Dunaliella*. s.l. : Oxford: Blackwell Science, p.273-280, 2004.
88. **Tripathi, U. et al.** *Production of astaxanthin in Haematococcus pluvialis cultured in various media*. s.l. : Bioresource Technology, n.68, p.197-199, 1999.
89. [http://opaio2.blogspot.ch/2012\\_06\\_01\\_archive.html](http://opaio2.blogspot.ch/2012_06_01_archive.html). visitado em Novembro 2012.

90. **Nobre, B.P., et al., et al.** *Biorefinery from Nannochloropsis sp. microalga - Extraction of microalgal oils and pigments and biohydrogen production from biomass leftover.* s.l. : Bioresource Technology Special Issue Biorefineries doi: 10.1016/j.biortech.2012.11.084, 2012.
91. **Sander, K. e Murthy, G.S.** *Life cycle analysis of algae biodiesel.* s.l. : International Journal Life Cycle Asses 15, 704-714, 2010.
92. **Tapie, P. e Bernardt, A.** *Microalgae Production: Technical and Economic Evaluations.* s.l. : Biotechnology and Bioengineering 32, 873-885, 1988.
93. **Xu, L., et al., et al.** *Assesment of a dry and a wet route for the production of biofuels from microalgae: Energy analysis.* s.l. : Bioresource Technology 102, 5113-5122, 2011.